

**Genetische Untersuchungen an Sepsis-induzierenden
E. coli Stämmen: Klonierung eines neuen Fimbrientyps**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

MARTINA PAWELZIK

Im Januar 1988



Deutsche Universitäten des 19. und 20. Jahrhunderts
E. mit 5000000. Bänden, 1000000. Bänden, 1000000. Bänden



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543113_0037

Genetische Untersuchungen an Sepsis-induzierenden E. coli Stämmen: Klonierung eines neuen Fimbrientyps

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie der
Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

MARTINA PAWELZIK

Im Januar 1988

Referent : Prof. Dr. W. Opferkuch

Korreferent: Prof. Dr. W. Hengstenberg

Die vorliegende Arbeit wurde an der Abteilung für Medizini-
sche Mikrobiologie und Immunologie der Medizinischen Fa-
kultät der Ruhr-Universität Bochum unter der Leitung von
Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch danke ich für die Überlassung des Themas und für seine großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann danke ich sehr für die Möglichkeit, einen Teil meiner Experimente in seinem Labor durchführen zu können und für seine ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Priv.-Doz. Dr. J. Hacker danke ich für die Hybridisierungsexperimente mit der radioaktiv markierten Genprobe, für die Überlassung des Plasmids pANN801-13 sowie seine Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Morgenroth danke ich für die Möglichkeit, an seinem Lehrstuhl elektronenoptische Untersuchungen durchführen zu können.

Frau S. Funke, Frau Dipl. Biol. S. Birkholz, Herrn Dr. Büscher, Herrn Dipl. Biol. H. Leying und Herrn Dr. H. Karch gilt mein Dank für die Unterstützung bei dieser Arbeit.

Ich danke allen Mitarbeitern der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Universitäten von Bochum und Hamburg für die gute Zusammenarbeit.

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	bovine serum albumin
DPBS	Phosphatpuffer nach Dulbecco
FCS	foetal calf serum
FITC	Fluorescein-iso-thiocyanat
IG	Immunglobulin
MØ	Makrophagen
MS	Mannose sensibel
MR	Mannose resistent
PBS	phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	" " " -Polyacrylamidgel- elektrophorese
Tris	Tris (Hydroxy) Aminomethan
TSA	Trypticase soy agar
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Klassifizierung der Fimbrien von E. coli	2
1.2. Rezeptorspezifität der Fimbrien von E. coli	4
1.3. MS-Fimbrien von E. coli	7
1.3.1. Subtypisierung und Charakterisierung der MS-Fimbrien	7
1.3.2. Biosynthese und Genetik der MS-Fimbrien	8
1.4. MR-Fimbrien von E. coli Isolaten extraintestinaler Infektionen	11
1.4.1. P-Fimbrien	11
1.4.1.1. Subtypisierung und Charakterisierung	11
1.4.1.2. Biosynthese und Genetik der P-Fimbrien	12
1.4.2. G-Fimbrien	15
1.4.3. S-Fimbrien	16
1.5. Regulation der Fimbriensynthese in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen	17
1.6. Bedeutung der Fimbrien als Pathogenitätsfaktor	18
1.7. Fragestellung	23
2. Material und Methoden	25
2.1. Material	25
2.1.1. Chemikalien	25
2.1.2. Bakterien	25
2.1.3. Zelllinien	25
2.1.4. Nährmedien für die Bakterienanzucht	27

	Seite
2.1.5. Nährmedium für Zellkulturen	27
2.1.6. Puffer und Lösungen	27
2.2. Methoden	30
2.2.1. Reinigung von Plasmid-DNS für die Gel- elektrophorese	30
2.2.2. Präparative Reinigung von Plasmid-DNS	31
2.2.3. Reinigung chromosomaler DNS	32
2.2.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS	33
2.2.5. Restriktionsenzymspaltung von Plasmid-DNS	34
2.2.6. Transposonmutagenese	34
2.2.7. Transformation	35
2.2.8. In vitro Rekombination von DNS	36
2.2.8.1. Spaltung und Dephosphorylierung des Vektors	36
2.2.8.2. Präparation chromosomaler DNS-Fragmente	37
2.2.8.3. Ligation des Vektors mit chromosomaler DNS	37
2.2.9. Elution plasmidaler DNS-Fragmente aus Agarose-Gelen	38
2.2.10. Herstellung radioaktiv markierter DNS	39
2.2.11. Herstellung biotinylierter DNS	39
2.2.12. Filterhybridisierung mit radioaktiver DNS	39
2.2.13. Filterhybridisierung mit biotinylierter DNS	40
2.2.14. Markierung plasmidkodierter Proteine im E. coli Minizellsystem	41
2.2.15. Isolierung von Fimbrien	42
2.2.16. Proteinbestimmung	42
2.2.17. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43



	Seite
2.2.18. Herstellung eines anti-Fimbrienantiserums	43
2.2.19. Colony-Blot-Test	43
2.2.20. Western-Blot	44
2.2.21. Ganzzell-ELISA	44
2.2.22. ELISA mit gereinigten Fimbrien	45
2.2.23. Indirekte Immunfluoreszenz mit Bakterien	46
2.2.24. Elektronenmikroskopie	47
2.2.25. Bakterienadhärenz an Nierengewebsschnitte	47
2.2.26. Adhärenz von Bakterien an Zelllinien	48
2.2.27. Adhärenz von Bakterien an humane polymorph- kernige Leukozyten	49
3. Ergebnisse	50
3.1. Beteiligung von Plasmiden an der Ex- pression von Fimbrien	51
3.1.1. Darstellung der Plasmide der Blutkultur- Isolate	50
3.1.2. Transposonmutagenese und Transformation	52
3.1.3. Überprüfung der Fimbrienexpression bei Transformanten	56
3.2. Klonierung der chromosomalen DNS eines Blutkultur-Isolates	58
3.3. Typisierung der klonierten Fimbrien	61
3.3.1. Funktionelle Charakterisierung durch Agglutination	61
3.3.2. Gelelektrophoretische Charakterisierung	62

	Seite
3.3.3. Immunologische Charakterisierung	64
3.3.4. Genetische Charakterisierung	67
3.3.4.1. Restriktionsanalyse des klonierten DNS-Fragments	67
3.3.4.2. Hybridisierung mit der sfa-Genprobe	73
3.4. Darstellung der am Fimbrienaufbau be- teiligten Genprodukte	75
3.5. Phasenvariation der klonierten Fimbrien	78
3.6. Untersuchungen zur biologischen Funktion der klonierten Fimbrien	79
3.7. Vorkommen der klonierten Fimbrien auf weiteren E. coli Blutkulturisolaten	80
3.7.1. DNS-Filterhybridisierung	81
3.7.2. ELISA der Blutkultur-Isolate mit Anti- serum gegen die klonierten Fimbrien	83
3.8. Häufigkeit des klonierten Fimbrientyps bei E. coli	84
4. Diskussion	85
4.1. Lokalisation der Fimbriengendeterminanten bei Blutkultur-Isolaten	85
4.2. Klonierung und Charakterisierung von Fim- brien des E. coli Stammes BK 658	86
4.3. Darstellung der pBR658-6-Genprodukte	93
4.4. Expression und pathogene Bedeutung der klonierten Fimbrien	94

	Seite
5. Zusammenfassung	98
6. Literaturverzeichnis	101

1. Einleitung

Escherichia coli ist ein Keim, der zur physiologischen Fäkalflora des Menschen gehört. Unter bestimmten Voraussetzungen können diese Bakterien jedoch im Darm oder auch an nichtphysiologischen Standorten im Wirt schwere Infektionen hervorrufen. Zu den häufigsten Erkrankungen, die von *Escherichia coli* außerhalb des Darmkanals hervorgerufen werden, zählen neben Harnwegsentzündungen auch Entzündungen der Gallenblase und des Gallenwegs, die Peritonitis, die Pneumonie, Wundinfektionen aber auch die Sepsis und bei Säuglingen die Meningitis (135).

Keime, die derartige Infektionen hervorrufen können, sind mit besonderen Virulenzfaktoren ausgestattet. Zu diesen Virulenzfaktoren gehört sicherlich die Serumresistenz (10, 25, 39, 88), die Produktion einer Kapsel (12, 35, 68, 73, 92), die Hämolysinproduktion (34, 49, 125, 139, 145) und die Bildung ganz spezifischer Eisentransportsysteme (15, 95, 146-148). Der wichtigste Virulenzfaktor ist vermutlich jedoch die Expression von Fimbrien. Während alle anderen Faktoren nur für Keime aus bestimmten Infektionskrankheiten charakteristisch sind, werden Fimbrien von fast allen pathogenen *Escherichia coli* Stämmen gebildet (69). Das pathogene Potential der Fimbrien ist dabei in ihrer Fähigkeit begründet, die Adhärenz der Bakterien an bestimmte Zielzellen im Wirt zu vermitteln (9, 42, 65, 138). Dadurch

wird verhindert, daß die Keime durch unspezifische Reinigungsmechanismen (Sekrete, Urinfluß) wieder aus dem Wirt ausgespült werden. Das Adhärenzvermögen der Bakterien stellt damit eine grundlegende Voraussetzung für die Entstehung einer Infektion dar.

1.1. Klassifizierung der Fimbrien von E. coli

Auf Coli-Keimen ist eine große Anzahl verschiedener Fimbrientypen bzw. Pili identifiziert worden. Obwohl vorgeschlagen wurde, unter dem Begriff "Pili" nur solche Strukturen zusammenzufassen, die am konjugativen DNA-Transfer beteiligt sind, werden beide Begriffe synonym verwendet.

Die Klassifizierung der Fimbrien erfolgte ursprünglich aufgrund ihres Hämagglutinationsverhaltens. Dabei wurden von Duguid et al. (23) zunächst zwei Typen unterschieden. Zum einen Fimbrien, deren Adhärenz durch alpha-D-Mannose inhibierbar ist. Diese Fimbrien werden als Mannose sensibel (MS) bezeichnet. Zum anderen Fimbrien, deren Bindung Mannose resistent (MR) ist.

Mit der Identifizierung immer neuer Fimbrien reichte diese Einteilung jedoch nicht mehr aus, sodaß weitere Charakteristika, wie z.B. die serologischen Eigenschaften, bei der Typisierung berücksichtigt wurden. Dabei unterschieden Ørskov und Ørskov (111) die bekannten Fimbrien in dreizehn

Tabelle 1: Fimbrientypen von *E. coli*

Fimbrientyp	Serotyp	MG der Fimbrien- untereinheiten	Durchmesser (nm)	Lokalisation der genet. Determinante	Referenz
Typ 1 (1A, 1B, 1C)	F1	17.000	7	Chromosom	13, 63
CFA1	F2	15.000	3,2	Plasmid	29, 149
CFA2 (CS1, CS2, CS3)	F3	16.800 (CS1) 15.300 (CS2) 14.500 (CS3) 15.500	3,2 3,2	Plasmid	30, 99, 126
K88 (K88ab, ac, ad)	F4	27.540 (ab) 25.000 (ac) 26.000 (ad)	2,1	Plasmid	37, 96, 129
K99	F5	18.400	5	Plasmid	18, 109
987P	F6	23.000	7	Chromosom	54
P	F7 bis F13	17.000 bis 22.000	7	Chromosom	40, 102, 142
G		19.000	?	Chromosom	118
S		16.500 bis 17.000	7	Chromosom	38, 112
F41		29.500	3,2	Chromosom	19, 98

verschiedene Fimbrientypen (F-Typen), die mit F1 bis F13 bezeichnet wurden. In Tabelle 1 sind die bisher bekannten Fimbrien und ihre wichtigsten Charakteristika zusammengefaßt.

1.2. Rezeptorspezifität der Fimbrien von *E. coli*

Die einzelnen Fimbrien unterscheiden sich nicht nur in ihren serologischen Eigenschaften und dem Molekulargewicht ihrer Proteinuntereinheiten. Vielmehr zeichnen sich auch deutliche Unterschiede in den Bindungseigenschaften der verschiedenen Fimbrienstrukturen ab (Tabelle 2). Das Bindungsvermögen spiegelt sich dabei in der unterschiedlichen Adhärenz an Epithelzellen wider aber auch in dem Vermögen, Erythrozyten verschiedener Tierspezies zu agglutinieren (31).

Bisher sind nur einige der epithelialen Rezeptoren auf molekularer Ebene bekannt. Die entsprechenden Fimbrienadhäsine lassen sich dabei hinsichtlich ihrer Karbohydratspezifität in drei Hauptgruppen einteilen. Die erste Gruppe beinhaltet die Mannose sensiblen Typ 1 Fimbrien, die an alpha-D-Mannose-haltige Strukturen binden (23). Alpha-D-Mannose ist auf eukaryontischen Zellen hauptsächlich in Form von Glycopeptiden des Oligomannosid-Typs ($\text{Man}_5\text{GalNac}_2$) enthalten. Da diese Struktur auf einer Vielzahl von Zellen zu finden ist, haben Typ 1 Fimbrien keine Wirtsspezifität (100).

Tabelle 2: Rezeptorspezifität der Fimbrien von *E. coli*

Fimbrientyp	Rezeptor	Lokalisation des Rezeptors	Wirtsspezifität
Typ 1	alpha-D-Mannose	ubiquitär	keine
CFA1	Gangliosid M2	Dünndarm	Mensch
CFA2		Dünndarm	Mensch
K88	Gal-alpha-(1-3) - Gal-beta	Dünndarm	Schwein
K99	Glycophorin A	Dünndarm	Schwein, Rind Schaf
987P		Dünndarm	Schwein
P	Gal-alpha-(1-4) - Gal-beta	Niere	Mensch
G	N-acetyl-D-Glucosamin		Mensch
S	Sialyl-alpha-(2-3) - Galactosid	Niere, Gehirn u.a. Organe	Mensch
F41	N-acetylgalactosamin	Dünndarm	Rind

Referenzen siehe Text

Die zweite Gruppe umfaßt Fimbrien, die Digalactoside erkennen. Dazu gehören neben den P-Fimbrien humanpathogener *E. coli* Stämme, die an Bestandteile des menschlichen P-Blutgruppenantigens (Gal- α (1-4)Gal- β) binden, auch K88-Fimbrien, deren Rezeptor ein Glycolipidbestandteil (Gal- α (1-3)Gal- β) der Oberfläche von Dünndarmzellen von Schweinen darstellt (76, 100).

Die dritte Gruppe beinhaltet Fimbrien, die Sialinsäurehaltige Glykokonjugate erkennen. Dies sind zum einen die S-Fimbrien humanpathogener Stämme, die an Sialyl- α -(2-3)galactosyl-Strukturen binden und zum anderen die K99-Fimbrien, deren Rezeptoren auf Dünndarmzellen von Kälbern, Lämmern und Schweinen lokalisiert sind (67, 100).

Trotz der verwandtschaftlichen Beziehungen, die zwischen tierpathogenen und humanpathogenen *E. coli* Stämmen hinsichtlich ihrer Rezeptorspezifität zu bestehen scheinen, haben *E. coli* Stämme mit den Fimbrienantigenen K88, K99, 987P und F41 für menschliche Infektionskrankheiten offensichtlich keine Bedeutung. Bisher ist keine Arbeit bekannt, in der einer dieser Fimbrientypen auf einem humanpathogenen *E. coli* Stamm identifiziert wurde. Die sogenannten CFA-Antigene werden nur bei humanpathogenen Stämmen gefunden, die Durchfallserkrankungen induzieren können. Daher soll im Folgenden auf diese Fimbrientypen nicht näher eingegangen werden.

1.3. MS-Fimbrien von *E. coli*

1.3.1. Subtypisierung und Charakterisierung der MS-Fimbrien

Typ 1 Fimbrien, die auch als MS-Fimbrien bezeichnet werden, sind aus 17 K Proteinuntereinheiten aufgebaut. Diese Untereinheiten sind zu einer rechtsgewundenen Helix zusammengelagert, die einen Durchmesser von 7 nm hat und durch hydrophobe Wechselwirkungen zusammengehalten wird (14).

Insgesamt sind drei verschiedene Typ 1 Fimbrien beschrieben, Typ 1A, 1B und 1C (63). Diese Fimbrien unterscheiden sich nicht nur serologisch voneinander. Vielmehr differieren die einzelnen Subtypen auch hinsichtlich ihrer physikochemischen und funktionellen Eigenschaften. Im Gegensatz zu 1B und 1C reicht bei 1A Fimbrien eine Behandlung mit 2% SDS nicht aus, um die hydrophoben Wechselwirkungen zu lösen und die Fimbrien in ihre Untereinheiten zu dissoziieren. Für die Solubilisierung dieses Fimbrientyps ist eine Behandlung mit Säure oder Guanidinhydrochlorid erforderlich (28). Adhäsive Eigenschaften konnten bisher nur für Typ 1A nachgewiesen werden. Diese Fimbrien bewirken neben der Adhärenz an Epithelzellen und der charakteristischen Mannose sensiblen Agglutination von Meerschweinchenerythrozyten, auch eine Bindung an das Tamm Horsfall Protein des Urinaltraktes (24, 110). Derartige Eigenschaften sind für 1B und 1C Fimbrien nicht bekannt.

1.3.2. Biosynthese und Genetik der MS-Fimbrien

Molekularbiologische Untersuchungen zu MS-Fimbrien sind bisher hauptsächlich an Typ 1A durchgeführt worden. Während zu Typ 1B keine Daten vorliegen, ist von Typ 1C neben der Größe der genetischen Determinante lediglich bekannt, daß am Aufbau der Fimbrien mehrere Helferproteine beteiligt sind (140).

Analysen der genetischen Determinante, die für Typ 1A Fimbrien kodiert ergaben, daß das Operon sieben Gene beinhaltet (Abb.1).

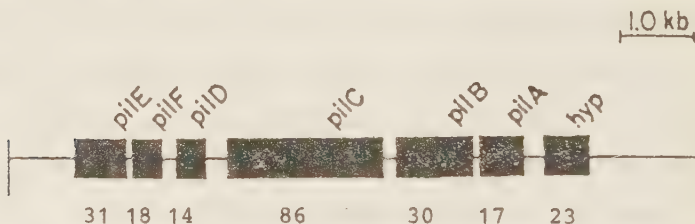


Abb.1: Genetische Organisation des Typ 1A Operons. Die Kästchen repräsentieren die einzelnen Gene, die an der Pilussynthese beteiligt sind. Unter jedem Kästchen ist das Molekulargewicht des entsprechenden Genproduktes in Kilodalton angegeben (nach Maurer und Orndorff, 1987).

Sechs der Gene (*pilA* bis *F*) sind direkt an der Synthese des funktionsfähigen Pilus beteiligt (91, 105). Ein weiteres Gen, *hyp*, übt eine Kontrollfunktion aus (106). Durch Transposoninsertionsmutagenesen konnte gezeigt werden, daß die Transkripte von *pilB* und *C* für die Piluspolymerisation

verantwortlich sind, während das pilA-Genprodukt die Fimbrienuntereinheit selbst repräsentiert (105, 107). Das Primärtranskript von pilA ist ein Precursor, der - wie fast alle sezernierten Proteine - eine N-terminale Signalsequenz enthält (107). Dieses 23 Aminosäuren-lange Signalpeptid interagiert mit zellulären Komponenten und initiiert den Transfer des Proteins über die Cytoplasmamembran. Anschließend wird das Amino-terminale Ende durch eine membrangebundene Peptidase abgespalten und die Untereinheit in den wachsenden Pilus eingebaut (22). Die Zusammenlagerung von Typ 1 Fimbrien kann damit in drei Schritte unterteilt werden: 1) Synthese eines Precursors 2) Sekretion und Reifung der Proteinuntereinheit 3) Inkorporation der reifen Fimbrienuntereinheit in die wachsende Organelle.

Im Gegensatz zu Flagellen, die jeweils an der Spitze verlängert werden, erfolgt der Einbau neuer Fimbrienuntereinheiten in den wachsenden Pilus stets an der Fimbrienbasis, und zwar direkt an der Oberfläche der äußeren Membran (83). Für die Termination der Piluselongation ist ein 18 K pilF-Genprodukt verantwortlich. PilF ist vermutlich ein pilusähnliches Protein, das anstelle von PilA in den Pilus eingebaut wird und anschließend die Addition weiterer Pilusuntereinheiten stoppt (91).

Die Produktion der PilA Untereinheiten unterliegt zwei Regulationsmechanismen. Der erste Mechanismus ist ein meta-

stabiler An/Aus-Mechanismus, der auch als Phasenvariation beschrieben ist. Dabei wird die Expression der Typ 1A Fimbrien mit einer Frequenz von 10^{-3} pro Zellgeneration auf der Transkriptionsebene an- und abgeschaltet (26). Für diesen Vorgang ist eine Genregion verantwortlich, die direkt oberhalb des Fimbrienstrukturgens *pilA* lokalisiert ist. Diese Region beinhaltet ein invertibles 314 Basenpaarsegment, dessen wechselseitige Orientierung das An- und Ausschalten des *pilA* Promotors bewirkt (1). Die Häufigkeit der Inversion wird durch ein Gen, das außerhalb des Typ 1A Operons liegt, kontrolliert (128).

Der zweite Regulationsmechanismus der Typ 1A Fimbriensynthese beinhaltet ein 23 K hyp Genprodukt. Die Aktivität des hyp Genproduktes scheint nicht den metastabilen An/Aus-Mechanismus zu beeinflussen, sondern reguliert die Transkription nur in der "An"-Phase. Vermutlich interferiert das Protein mit einer oder mehreren Stellen in direkter Nachbarschaft von *pilA* und übt dort eine Repressor-ähnliche Funktion aus (106, 108).

Für die Ausprägung der adhäsiven Eigenschaften der Typ 1A Fimbrien ist nicht nur die Synthese eines intakten Pilus erforderlich, vielmehr bedarf es noch der Expression eines 31 K *pilE* Genproduktes. Die Wirkung dieses Polypeptides ist bisher nicht geklärt. Zum einen könnte das *pilE* Genprodukt direkt die Adhärenz bewirken, indem es an den

Das pap-Operon besteht aus insgesamt neun Genen, die mit papA bis papI gekennzeichnet worden sind (Abb. 2).

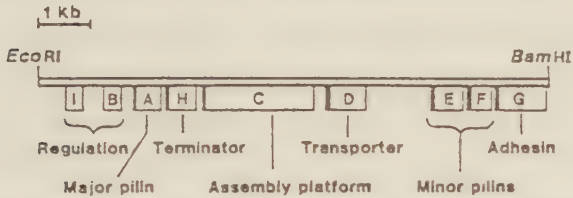


Abb. 2: Genetische Organisation des pap-Operons. Die Kästchen repräsentieren die einzelnen Gene (nach Lindberg et al. 1987).

Zwei der Gene, papI und papB, üben eine positive regulatorische Funktion auf die Transkription des Fimbrienstrukturgens papA aus (7, 78). Die anderen Gene kodieren für Proteine, die direkt am Aufbau der Fimbrien beteiligt sind (Abb. 3).



Abb 3: Biosynthese der F13-Fimbrien. Plus und Minus gibt die Fähigkeit, an Epithelzellen zu adhären wieder. Erläuterung siehe Text. Nach Lindberg et al. 1987.

PapC ist ein Protein der äußeren Membran, das als Basis für die Piluspolymerisation fungiert (80). Die Pilinuntereinheiten A, E, F und H und wahrscheinlich auch PapG werden zu dem Basalprotein mit Hilfe des periplasmatischen papD Genproduktes (PapD) transportiert (80). Ähnlich wie bei Typ 1 Fimbrien werden auch P-Fimbrien von unten, d.h. von der Basis aus verlängert. Der erste Schritt der P-Fimbriensynthese ist dabei die Assoziation des Adhäsins PapG mit dem PapC Membranprotein. Anschließend folgt PapF, dem eine Verstärkerfunktion in der Pilussynthese zugesprochen wird. Mutanten, denen PapF fehlt, zeigen eine drastisch reduzierte Fimbrienexpression (78). An PapF werden einige PapE Untereinheiten geknüpft, die für die effiziente Bindung des Adhäsins mit der restlichen Pilusstruktur verantwortlich sind (78). Mit der Anlagerung von PapE ist das Bakterium bereits in der Lage, an Zielzellen zu adhärieren. Nach PapE werden noch etwa 10^3 PapA Fimbrienuntereinheiten in den Pilus eingebaut. Die Termination der Pilussynthese erfolgt durch PapH, ein pilusähnliches Protein, das anstelle von PapA eingebaut wird und damit den Abbruch der Piluspolymerisation bewirkt (8). Der vollständige Pilus besteht demnach hauptsächlich (über 99%) aus dem Pilin A und im apikalen Bereich zu einem geringen Teil aus den Proteinen PapE, F und G.

Für die Ausprägung der adhäsiven Eigenschaften ist die Ex-

pression von P-Fimbrien selbst nicht nötig. Anders als bei Typ 1 Fimbrien kann das P-Fimbrienadhäsin unabhängig von der restlichen Pilusstruktur die Bindung an Zielzellen herbeiführen (79, 133). Warum trotzdem Fimbrien synthetisiert werden, ist nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich werden die Fimbrien dazu benötigt, das Adhäsin zu exponieren und damit sterisch in eine günstigere Position zu dem Rezeptor zu setzen (80). Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, daß zwar Laborstämme mit einem kurzkettigen Lipopolysaccharid (LPS) ohne Fimbrien in der Lage sind zu adhäreren. Wildstämmen mit langkettigem LPS oder einer Kapsel benötigen jedoch für die Bindung an Wirtszellen die Expression vollständiger, intakter Fimbrien (144).

1.4.2. G-Fimbrien

Kürzlich wurde von einem pyelonephritogenen E. coli Stamm ein weiterer, neuer Fimbrientyp isoliert, der mit "G" bezeichnet wurde (118). Das Molekulargewicht der Untereinheiten, aus denen die G-Fimbrien aufgebaut sind, liegt bei 19,5 K. Die biologische Funktion bzw. Bedeutung dieser Fimbrien ist bisher noch nicht geklärt. Über die genetische Organisation der G-Fimbrien ist bisher lediglich bekannt, daß für die Biogenese dieses Fimbrientyps ein etwa 10 Kb großes DNS-Fragment verantwortlich ist (118).

1.4.3. S-Fimbrien

S-Fimbrien werden hauptsächlich von Sepsis- bzw. Meningitis-induzierenden *E. coli* Stämmen exprimiert, finden sich jedoch auch auf einigen uropathogenen Stämmen. Dieser Fimbrientyp konnte bisher ausschließlich auf O6:K⁺, O18:K1 und O83:K1 Stämmen nachgewiesen werden (38, 64, 112).

Funktionell lassen sich alle S-Fimbrien durch ihre Mannose resistente, Neuraminidase sensible Agglutination von Rindererythrozyten nachweisen (67, 114). Die bisher beschriebenen S-Fimbrien stellen eine recht einheitliche Gruppe dar, die sich stark hinsichtlich ihrer serologischen Eigenschaften ähnelt (64, 112). Homologien zwischen den S-Fimbrien verschiedener *E. coli* Stämme und Serotypen bestehen nicht nur auf serologischer, sondern auch auf der DNS-Ebene. Mit spezifischen DNS-Proben, die Teile der S-Fimbriendeterminante (sfa-Determinante) repräsentieren, konnten Ott et al. (112) nachweisen, daß sich die einzelnen S-Fimbriendeterminanten nur geringfügig, wenn überhaupt, voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu Typ 1 und P-Fimbrien konnten bei S-Fimbrien bisher keine Subtypen identifiziert werden.

Die genetische Determinante, die für S-Fimbrien kodiert, umfaßt eine Strecke von 6,5 kB und kodiert für neun verschiedene Genprodukte (38, 121). Insgesamt scheint die sfa-Determinante ähnlich organisiert zu sein wie die P-

Fimbriendeterminante. Auch das sfa-Operon enthält Abschnitte, denen Kontrollfunktionen zugesprochen werden, als auch Bereiche, die für die Biogenese, Adhärenz und die Produktion der Fimbrienuntereinheiten verantwortlich sind (38). Angaben darüber, welche Genprodukte welche Aufgaben übernehmen sowie Angaben über den exakten Aufbau des nativen Pilus sind über S-Fimbrien jedoch noch nicht publiziert. Bisher ist lediglich beschrieben, daß der native S-Pilus aus mindestens zwei verschiedenen Proteinen aufgebaut ist. Dabei handelt es sich zum einen um die 16,5 bzw. 17,0 K Fimbrienuntereinheit (38, 112) und zum anderen um ein 12 K Polypeptid, das das Adhäsin repräsentiert (94). Das Adhäsin stellt jedoch weniger als 1% der gesamten Pilusmasse dar. Mit Hilfe monoklonaler Antikörper konnte gezeigt werden, daß das Adhäsin ausschließlich an der Spitze des Pilus lokalisiert ist. Für die Ausprägung der adhäsiven Eigenschaften ist der Pilus jedoch nicht unbedingt erforderlich. Adhäsin und Pilus können unabhängig voneinander zur Expression gebracht werden (38, 94).

1.5. Regulation der Fimbriensynthese in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

Vielfach unterliegt die Synthese der Fimbrien neben internen genetischen Kontrollmechanismen, auch der Regulation durch das externe Milieu. So konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, daß bei Wachstumstemperaturen unter

20°C die Synthese von MR-Fimbrien drastisch reduziert ist (36, 111, 134). Während bei S-Fimbrien dieser temperatur-regulative Mechanismus nicht geklärt ist, scheint bei den P-Fimbrien dieser Effekt auf eine Aktivierung des papB Kontrollgens zurückzuführen zu sein (134).

Der Zusatz von Glucose zum Nährmedium reprimiert ebenfalls die Expression der Fimbrien. Dieser Effekt ähnelt der Katabolitrepression, ein Mechanismus, durch den die metabolische Aktivität der Bakterien als Antwort auf verschiedene Zucker reguliert wird. Glucose erniedrigt dabei den für die Transkription einiger Gene erforderlichen cAMP-Spiegel. Für Typ 1 Fimbrien von *E. coli* scheint der Glucose-Effekt jedoch eher auf einen Wachstumsvorteil, und damit auf das selektive Auswachsen nicht-pilierter Zellen zurückzuführen zu sein als auf einen regulatorischen Prozeß in der Fimbriensynthese (27). Dagegen konnte für P-Fimbrien klar die Beteiligung von cAMP und dem entsprechenden Rezeptorprotein (CRP) an der Expression des papA-Gens gezeigt werden (7, 134). Vermutlich stimuliert der cAMP-CRP-Komplex die Transkription des Regulatorgens papB und dadurch auch die Transkription des Fimbrienstrukturgens papA.

1.6. Bedeutung der Fimbrien als Pathogenitätsfaktor

Die Bedeutung der Fimbrien bei der Entstehung extraintestinaler *E. coli* Infektionen wurde in verschiedenen Un-

tersuchungen dargelegt. Dabei handelt es sich zum einen um epidemiologische Studien, in denen die Assoziation bestimmter Fimbrientypen mit pathogenen Keimen gezeigt werden konnte. Zum anderen wurde in vielen in vivo Versuchen direkt die Beteiligung der Fimbrien an der Pathogenität von *E. coli* gezeigt.

Analysen der *E. coli* Stämme, die aus Patienten mit einem Harnwegsinfekt oder einer Sepsis isoliert wurden, ergaben, daß die meisten pathogenen Keime mehrere Fimbrientypen exprimieren. Dabei bilden fast alle Stämme - unabhängig von der Herkunft - Typ 1 Fimbrien. Darüber hinaus exprimieren 80-90% der pyelonephritogenen Stämme auch noch P-Fimbrien (136). Bei den Sepsis Isolaten zeigte sich, daß neben Typ 1 Fimbrien häufig auch P- oder S-Fimbrien gebildet werden (68).

Typ 1 Fimbrien werden sowohl von pathogenen als auch von apathogenen *E. coli* Stämmen exprimiert. Da diese Fimbrien zudem noch eine Bindung an Phagozyten bewirken, wurde die Bedeutung dieses Fimbrientyps als Virulenzfaktor häufig in Frage gestellt (119, 124). Wie wichtig jedoch Typ 1 Fimbrien in der Entstehung eines Harnwegsinfektes sind, wurde von Iwahi et al. (55) und Hultgren et al. (52) erstmals im Tiermodell gezeigt. Dabei wurden in die Blasen von Mäusen fimbrierte *E. coli* Stämme bzw. die nicht-fimbrierten Varianten injiziert. Anschließend Untersuchungen der Bla-

senhomogenate ergaben, daß die fimbrierten Keime das Blasenurothelium wesentlich effizienter besiedeln konnten als die entsprechenden fimbrienlosen Varianten. Ähnliche Ergebnisse wurden von Keith et al. (62) auch im Ratteninfektionsmodell erzielt. Dabei wurden in dieser Studie keine Varianten, sondern definierte Mutanten verwendet.

Weitere Hinweise, daß Typ 1 Fimbrien an der Entstehung einer Infektion beteiligt sind, lieferten Hemmversuche mit Rezeptoranaloga oder Antikörpern. Die Gabe von alpha-D-Mannose konnte sowohl im Ratten- als auch im Mausmodell eine Infektion mit Typ 1 fimbrierten *E. coli* verhindern (5, 48). Antikörper, die in vitro die Adhärenz der Keime an Uroepithelzellen inhibieren, führen auch in vivo zu einem deutlichen Schutz der Versuchstiere vor Infektionen (2).

Neben den adhäsiven Eigenschaften an Uroepithelzellen, scheinen Typ 1 Fimbrien durch ihre Interaktion mit dem Tamm Horsfall Protein der Niere auch einen gewissen Schutz der Bakterien vor der Infektabwehr des Wirtes zu bewirken. Tamm Horsfall Protein (THP) ist ein Protein, das in der Niere synthetisiert wird und in den Urin sezerniert wird. Elektronenoptische Untersuchungen zeigten, daß dieses Protein an Typ 1 Fimbrien bindet und dabei eine Pseudokapsel um die Bakterien bildet. Derart umhüllte Keime werden ausgesprochen schlecht von polymorphkernigen Leukozyten pha-

gozytiert (72). Diese Beobachtung könnte insbesondere die Virulenz Typ 1 fimbrierter Keime in der Blase erklären, wo praktisch keine Serumaktivität vorhanden ist.

In vivo Mischinfektionen mit Keimen, die entweder MS und/oder MR-Fimbrien exprimieren, deuten darauf hin, daß die beiden Fimbrientypen in unterschiedlichen Regionen des Harnwegstraktes am Infektionsprozeß beteiligt sind. Werden Ratten transurethral mit S oder Typ 1 fimbrierten E. coli Stämmen infiziert, so lassen sich aus der Niere hauptsächlich Bakterien isolieren, die S-Fimbrien exprimieren. Im Gegensatz dazu überwiegt in der Blase der Anteil der Bakterien, die Typ 1 Fimbrien bilden (89). Ähnliche Befunde konnten auch mit P-fimbrierten Stämmen im Maus-Modell erzielt werden. Im Vergleich zu fimbrienlosen Keimen, führten P-Fimbrien-tragende E. coli Stämme zu einer deutlichen Zunahme der Besiedlung von Niere und Blase. Transformanten, die zusätzlich noch Typ 1 Fimbrien exprimierten, führten zu einer Steigerung der Bakterienzahl in der Blase, nicht aber in der Niere (44).

Die pathogene Bedeutung der S-Fimbrien konnte auch in verschiedenen Sepsis- bzw. systemischen Infektionsmodellen in Mäusen dargelegt werden (39, 104). Hacker et al. (39) injizierten dazu den Versuchstieren subcutan einen virulenten Wildtyp oder seine isogenen Mutanten, die mehrere Virulenzfaktoren (S-Fimbrien, Serumresistenz, Hämolysinproduktion,

verloren hatten. Im Gegensatz zu dem virulenten Wildtyp waren diese Keime völlig avirulent. Durch die Reintroduktion klonierter Virulenzgene in diese Mutanten konnte gezeigt werden, daß S-Fimbrien im Zusammenhang mit der Serumresistenz die Virulenz der Mutanten im Sepsis-Modell wiederherstellten. Für die Wiederherstellung der Nephropathogenität reichte sogar die Reintroduktion der S-Fimbriengene alleine aus (41).

1.7. Fragestellung

Die Fimbrien pathogener *E. coli* Stämme nehmen im Infektionsprozeß eine zentrale Stellung ein. Als Träger von Adhäsinen vermitteln diese Strukturen spezifisch die Bindung an Zielzellen im Wirt und verhindern dadurch, daß die eindringenden Keime durch unspezifische Reinigungsmechanismen (Urinfluß, Blutstrom, Darmperistaltik, Sezernierung muköser Sekrete) wieder aus dem Wirt eliminiert werden. Fimbrien von *E. coli* sind hochimmunogen. Unter dem ständigen Druck der Infektabwehr und in Anpassung an bestimmte Rezeptoren ist eine Vielzahl verschiedener Fimbrientypen entstanden, die sich stark hinsichtlich ihrer serologischen und funktionellen Eigenschaften unterscheiden. Dabei wurde häufig beobachtet, daß bestimmte Fimbrientypen mit charakteristischen Krankheitsbildern assoziiert sind. Während die Fimbrien uropathogener und darmpathogener *E. coli* Stämme molekularbiologisch hinreichend untersucht sind, sind derartige Studien an Sepsis-induzierenden Stämmen kaum durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit sollten daher zunächst bei zehn ausgesuchten *E. coli* Blutkultur-Isolaten genetische Untersuchungen hinsichtlich der Fimbrienexpression durchgeführt werden. Dazu sollte in einem ersten Schritt geklärt werden, ob die Fimbrien dieser Stämme plasmid- oder chromosomalkodiert sind. In einem zweiten Schritt sollten Fimbrien des Stammes BK 658 durch die Übertragung von DNS in den Laborstamm *E. coli* HB 101 kloniert werden.

E. coli BK 658 exprimiert neben Typ 1A und 1B Fimbrien einen dritten Fimbrientyp, der mit anti-S-Fimbrienantisera reagiert, aber nicht die für S-Fimbrien typische Agglutination von Rindererythrozyten zeigt. Durch die selektive Übertragung dieses Fimbrientyps und anschließende Untersuchung der Fimbrien hinsichtlich ihrer physikochemischen, funktionellen und serologischen Eigenschaften sowie durch Analysen der genetischen Determinante, sollte dieser Fimbrientyp charakterisiert und seine verwandtschaftliche Beziehung zu bereits beschriebenen Fimbrien geklärt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma Chemicals (München) bezogen.

2.1.2. Bakterien

Bei den untersuchten E. coli BK-Stämmen (siehe auch Tabelle 3) handelt es sich um Keime, die im Institut für Med. Mikrobiol. und Immunol. der Ruhr-Universität Bochum aus Blutkulturen von Patienten mit bestehender Sepsis isoliert worden sind. Die verwendeten Stämme aus Stuhl- und Urinproben wurden ebenfalls in diesem Labor isoliert. Die E. coli Laborstämme HB 101 und C 600pMR5 sowie der Stamm DS 410 (Tab. 3), wurden von Prof. Heesemann (Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.3. Zelllinien

Für die Adhärenztests wurde die Maus-Makrophagenzelllinie P388 D1 (17) sowie die HeLa-Epithelzelllinie verwendet. Die HeLa-Zellen wurden von Prof. Heesemann zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Verwendete Bakterien

Stamm	Eigenschaften	Fimbrien
HB 101	hsdR, hsdM, recA, Str ^r	-
C 600pMR5	Amp ^r , Kana ^r , Te ^r , Str ^r	-
DS 410	Minizellproduzierer	-
BK 595	Wildtyp, Serotyp 08	+
BK 658	Wildtyp, Serotyp 075:K1:H7 (Fimbrien: 1A, 1B, S-ähn1.)	+
BK 797	Wildtyp, Serotyp n.b.	+
BK 1001	Wildtyp, Serotyp 023	+
BK 1034	Wildtyp, Serotyp 079	+
BK 1361	Wildtyp, Serotyp 053	+
BK 1369	Wildtyp, Serotyp 08	+
BK 740	Wildtyp, Serotyp 015	+
BK 944	Wildtyp, Serotyp 06	+
BK 1454	Wildtyp, Serotyp 06	+

2.1.4. Nährmedien für die Bakterienanzucht

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in TSB-Medium (BBL, Cockeysville). Für die Transformation wurde LB-Medium (10 g Tryptone, Difco, Detroit, 5 g Hefeextrakt, Difco, 10 g NaCl ad 1 Liter H₂O, pH 7,5) verwendet. Alle funktionellen Tests (Agglutinationstests, Adhärenztests) wurden mit Bakterien durchgeführt, die in Mueller-Hinton-Medium bzw. auf Mueller-Hinton-Agar (BBL) angezüchtet worden sind.

2.1.5. Nährmedium für Zellkulturen

Als Grundmedium wurde "Dulbecco's modified Eagles medium" (DMEM) von Gibco verwendet. Pro 500 ml Grundmedium wurden weiterhin zugefügt: 8 ml L-Glutamin (200 mM), 5 ml Na-Pyruvat (100 mM), je 6 ml Penicillin-Lsg. (10.000 Einheiten/ml) und Streptomycin-Lsg. (10 mg/ml) sowie 55 ml FCS.

2.1.6. Puffer und Lösungen

TE-Puffer

10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,0

TE(D)-Puffer

entspricht TE-Puffer 1:10 verdünnt

TED-Puffer

10 mM Tris, 0,1 mM EDTA pH 8,0

TES-Puffer

50 mM Tris, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl pH 8,0

Tris-Borat-Puffer

89 mM Tris, 2 mM EDTA, 89 mM Borsäure pH 8,0

Tris-Acetat-Puffer

40 mM Tris, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 8,0

TBS-Puffer

50 mM Tris, 200 mM NaCl pH 7,4

PBS

150 mM NaCl, 8 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 pH 7,2

SSC

150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat pH 7,0

Lösungen für die Plasmidisolierung

-Doly I : 25 mM Tris, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose pH 8,0
Vor Gebrauch 2 mg/ml Lysozym zugeben

-Doly II: 0,2 N NaOH, vor Gebrauch 10 mg/ml SDS zugeben

-DolyIII: 3 M Na-Acetat, 3 M Essigsäure

Lösung für die Filterhybridisierung mit biotinylierter DNA

-Prähybridisationspuffer: 7 ml H_2O , 2 ml 50% Dextransulfat, 1 ml 10% SDS, 10 bis 15 Minuten bei 65°C mischen, 0,58 g NaCl zugeben und weitere 10 bis 15 Minuten bei 65°C inkubieren.

-Blockpuffer: 2% BSA, 0,05% Triton X-100, 5 mM EDTA in PBS

-Komplexpuffer: 0,1% BSA, 0,5% Triton X-100, 5 mM EDTA in PBS, vor Gebrauch DETEK I-alk (Enzo Biochem) in einer Verdünnung von 1:200 zugeben.

-Substratlösung: 9 ml alk. Phosphatase Substratpuffer (entspricht 150 mM Natriumbarbiturat in H_2O , mit Essigsäure auf pH 9,6 eingestellt), 1 ml Nitroblautetrazoliumlösung (1 g/ml), 0,1 ml Indolyolphosphat, 20 μl 2 M MgCl_2 .

Lösung zum Extrahieren von Ethidiumbromid

45,0 ml Isopropanol, 36,9 ml TES, 31,95 g CsCl

Substratlösung für Western-Blots

Substrat: 4-Chloro-1-Naphthol

3 mg/ml Methanol

Für die Entwicklung der Blots wird ein Teil Substrat-Lsg. mit fünf Teilen TBS und 30% H_2O_2 (Endkonzentration 0,01%) kurz vor Gebrauch gemischt.

Substratlösung für den ELISA

Substrat: o-Phenylendiamin

10 mg des Substrats wurden in 10 ml 0,1 M Natriumzitat-lsg, pH 4,5 gelöst und mit 4 μ l 30% H_2O_2 versetzt.

Eindeckpuffer für die Immunfluoreszenz

14 g Glycin, 17,5 ml 1 N NaOH und 17 g NaCl wurden in 1 l H_2O auf pH 8,0 eingestellt. Ein Teil des Puffers wurde mit zwei Teilen Glycerin gemischt und mit para-Phenylendiamin (Endkonzentration 10 mg/ml) gemischt. Der fertige Puffer kann bei $-20^{\circ}C$ längere Zeit gelagert werden.

Probenpuffer für die DNS-Gelelektrophorese

20% Ficoll, 0,05% Bromphenolblau in TES-Puffer

Probenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese

Der Puffer enthält: 20 ml Glyzerin, 5 ml 2-Mercaptoethanol, 25 ml 250 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2 g SDS, 10 mg Bromphenolblau und 50 ml H_2O dest.

Elektrodenpuffer für die SDS-Gelelektrophorese

In 5 l H_2O dest. wurden 100 g Glycin, 15 g Tris und 5 g SDS gelöst.

Färbelösung für SDS-Gele

0,7 g Coomassie Brilliant Blue R 250 (LKB, Bromma) wurden in 113 ml Methanol, 113 ml H_2O dest. und 23 ml Essigsäure gelöst.

Entfärbelösung für SDS-Gele

Die Entfärbelösung bestand aus 360 ml Methanol, 120 ml Essigsäure, 1520 ml H_2O dest.

2.2. Methoden

2.2.1. Reinigung von Plasmid-DNS für die Gelelektrophorese

Für die Darstellung der Plasmide im Agarose-Gel reichte die Plasmid-DNS von 2-4 ml Bakterienkultur (UNK) aus. Die Plasmid-DNS wurde durch alkalische Lyse der Keime nach der Methode von Birnboim und Doly (11) gewonnen. Schwer lysierbare Keime wurden zuvor je 1x für 5 min in TES (RT) und für 3 min in eiskaltem Aceton (auf Eis) gewaschen. Anschließend wurden die Keime für 30 sec in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert, in 200 μl Doly I resuspendiert und bei RT inkubiert. Nach 30 min wurden 400 μl Doly II hinzugefügt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 300 μl Doly III zugegeben und das Präzipitat nach einer Stunde Inkubation auf Eis für 5 min in einer Eppendorf-

Zentrifuge sedimentiert. 800 µl des Überstands wurden mit 600 µl kaltem (-20°C) Isopropanol versetzt und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte Plasmid-DNS wurde anschließend durch 5 minütige Zentrifugation (Eppendorf-Zentrifuge) sedimentiert, 1x mit 70% Äthanol vorsichtig gewaschen und anschließend in TE-Puffer gelöst.

2.2.2. Präparative Reinigung von Plasmid-DNS

Für die präparative Reinigung von Plasmid-DNS wurde eine Modifikation (47) der Methode von Birnboim und Doly angewandt. Die Bakterien aus 800 ml ÜNK wurden sedimentiert (Beckman-Rotor JA 14, 8000 Upm, 10 min) und in 50 ml Doly I resuspendiert. Nach 30 min bei RT wurden 100 ml Doly II zugefügt. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden 75 Doly III zugegeben und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde das Präzipitat sedimentiert (JA 14, 10.000 Upm, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde mit 1 M Na-Phosphat pH 7 auf eine Konzentration von 5 mM Na-Phosphat und mit 1 M MgCl_2 auf eine Konzentration von 15 mM MgCl_2 eingestellt. Die Plasmid-DNS wurde durch die Zugabe von PEG (Endkonzentration 10%) über Nacht bei 4°C gefällt. Anschließend wurden die Plasmide durch Zentrifugation (JA 14, 6000 Upm, 10 min, 4°C) sedimentiert und in 4 ml TES + 2 ml 50 mM EDTA (pH 8,0) aufgenommen. Danach wurde 1 ml einer Ethidiumbromidstamm-lösung (10 mg/ml TES) und 8,5 g CsCl zugegeben und die Ansätze bei RT inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Proben durch Glaswolle (in einer Einmalspritze) filtriert und

mit CsCl auf einen Refraktionsindex von 1,392 eingestellt. Die Ansätze wurden für 44 Stunden bei 39.000 Upm (Beckman-Rotor Ti50) und 14°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zentrifugenröhrchen unter UV-Bestrahlung unterhalb der Plasmidbande (untere Bande) mit einer Kanüle punktiert und die auslaufende Plasmid-DNS in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Das Ethidiumbromid wurde aus den Proben mit der Isopropanolphase des Ethidiumbromidentferners extrahiert. Anschließend wurden die Proben gegen TED dialysiert.

2.2.3. Reinigung chromosomaler DNS

Chromosomale DNS wurde, wie von Hacker et al. (38) beschrieben, isoliert. Dazu wurden 20 ml einer ÜNK in frischem LB-Medium verdünnt und etwa 3 bis 4 Stunden bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (JA 10, 10 min, 8000 Upm, 5°C) und in 20 ml 0,15 M NaCl/0,1 M EDTA (pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Bakterien in 10 ml 25% Saccharose/0,01 M Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert und mit weiteren 3 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) und 2 ml Lysozym-Lösung (20 mg/ml) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C unter leichtem Schütteln wurden die Ansätze in 100 ml Erlenmeyer-Kolben überführt, mit 2 ml 0,25 M EDTA (pH 8,0) und 2,4 ml 10% SDS versetzt und für 15 min bei RT geschüttelt. Danach wurde das Gemisch mit TES-Puffer auf ein Volumen von 50 ml aufgefüllt und nach Zugabe von 0,3 ml Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) bei 37°C bis zum völligen Aufklaren geschüttelt.

Anschließend wurden 12,5 ml 5 M NaClO_4 zupipettiert und der Ansatz mit gleichem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) in einer 1 l Flasche so lange geschüttelt, bis eine homogene Phase entstand. Nach Zentrifugation bei 2000 x g für 15 min bei RT wurde die obere, wäßrige Phase einschließlich der Interphase in ein Becherglas überführt, vorsichtig mit dem gleichen Volumen an eiskaltem 96% Äthanol überschichtet und die DNS an der Phasengrenze auf eine Glaspipette aufgewickelt. Die isolierte DNS wurde in 0,5 ml TES abgestreift und über Nacht gegen SSC dialysiert. Danach wurde die DNS mit einer RNase-Lösung (Endkonzentration 0,1 mg/ml) versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurde der Ansatz 2x mit Phenol und 2x mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, mit Äthanol überschichtet und die DNS durch Aufwickeln an der Phasengrenze isoliert. Die gereinigte DNS wurde in 0,5 ml TE abgestreift und gegen TED dialysiert.

2.2.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNS

Plasmid-DNS und chromosomale DNS wurden, wenn nicht anders angegeben, in Agarose-Gelen (Agarose (ME) von Seakem, Rockland) unter Verwendung von Tris-Borat-Puffer aufgetrennt. Dabei betrug die elektrische Feldstärke 3-4 Volt/cm. Zur Darstellung der DNS-Banden wurden die Gele mit Ethidiumbromid (2 µg/ml) 30 min im Dunkeln gefärbt, anschließend 5 min gewässert und danach unter UV-Bestrahlung mit einer Polaroid-Kamera fotografiert.

2.2.5. Restriktionsenzymspaltung von Plasmid-DNS

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden, wie von Maniatis (86) oder der Lieferfirma beschrieben, benutzt. Die Verdauung wurde jeweils für eine Stunde durchgeführt.

2.2.6. Transposonmutagenese

Für die Transposonmutagenese wurden die Blutkultur-Isolate zunächst mit einer Resistenz gegenüber Nalidixinsäure markiert. Dazu wurden die Keime in steigenden Konzentrationen von Nalidixinsäure so lange angezüchtet, bis die Bakterien in Gegenwart von 200 µg/ml wachsen konnten. Als Transposondonorstamm wurde der Streptomycin-resistente E. coli Stamm C 600pMR5 verwendet. Dieser Stamm enthielt das für Ampicillinresistenz kodierende Transposon Tn 801 auf dem pMR5-Plasmid. Das Plasmid enthält weiterhin Resistenzgene gegenüber Kanamycin und Tetracyclin. Das pMR5-Plasmid wurde durch Konjugation in die Blutkultur-Isolate eingeführt. Dazu wurden je 2 ml einer ÜNK des Donors und des Rezipienten gemischt, sedimentiert (2000 x g, 10 min), in 100 µl TSB resuspendiert und als Tropfen auf eine vorgewärmte Blutagarplatte übertragen. Nach 4 und 12 Stunden Inkubation bei 37°C wurde je die Hälfte des Bakterienrasens abgeimpft und in 1 ml 0,9% NaCl-Lsg. resuspendiert. Je 150 µl der Suspension wurden auf Selektioplatten (25 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Nalidixinsäure) überimpft. Trans-

konjuganten wurden auf ihren Plasmidgehalt überprüft und anschließend bei 42°C weitergezüchtet. Bei diesen Temperaturen wird die Replikation des pMR5-Plasmids weitgehend unterdrückt. Danach wurden die Kulturen auf Ampicillin-haltigem Agar (50 µg/ml) ausgestrichen und die gewachsenen Kolonien auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Kanamycin und Tetracyclin überprüft. Keime, die Ampicillin-resistent, aber Kanamycin- und Tetracyclin-sensibel waren (Transposonmutanten), enthielten das Transposon auf dem wirtseigenen Plasmid und hatten das pMR5-Plasmid des Donors verloren.

2.2.7. Transformation

Transformationen wurden nach der CaCl_2 -Methode (75) durchgeführt. Dazu wurden zunächst 50 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 0,5 ml einer UNK des zu transformierenden Bakterienstammes beimpft und in 500 ml Kolben unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei einer OD_{578} von 0,3 wurden die Kulturen für 5 min bei 8000 Upm (Beckman Rotor JA 20) und 4°C abzentrifugiert, die Keime in 20 ml eisgekühlter 0,1 M CaCl_2 -Lösung gewaschen, sedimentiert und erneut in 20 ml 0,1 M CaCl_2 resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubation auf Eis, wurden die Zellen abzentrifugiert (s.o.) und in 1 ml 0,1 M CaCl_2 aufgenommen. 200 µl dieser Keimsuspension wurden mit 5-100 µl Plasmid-DNS für 30 min auf Eis und anschließend für 5 min bei 42°C inkubiert. Nach Beendigung des Hitzeimpulses wurden die Ansätze auf Eis abge-

kühlt, mit 3 ml LB-Brühe + 0,2% Glucose versetzt und bei 37°C bebrütet. Nach 4 Stunden und 16 Stunden wurden jeweils 100 µl der Kultur auf Selektionsplatten (TSA mit 100 µg/ml Ampicillin) ausgestrichen.

2.2.8. In vitro Rekombination von DNS

Für die Klonierung chromosomaler DNS-Fragmente des Stammes BK 658 in E. coli HB 101 wurde das Plasmid pBR 322 als "Klonierungsvehikel" gewählt. Das Plasmid hat eine Größe von 4,3 Kilobasen und enthält Antibiotikaresistenzgene für Ampicillin und Tetracyclin sowie Erkennungssequenzen für verschiedene Restriktionsenzyme. DNS des Blutkultur-Isolates wurde in die Bam HI-Schnittstelle des Vektors ligiert (siehe 2.2.8.1. bis 2.2.8.3.).

2.2.8.1. Spaltung und Dephosphorylierung des Vektors

Etwa 1 µg Plasmid-DNS wurde in einem Volumen von 60 µl mit 10 U Bam HI bei 37°C verdaut. Nach 30 min wurden 10 U alkalische Phosphatase (Boehringer, Mannheim) zugesetzt, um die endständigen Phosphatgruppen des geschnittenen Vektors zu entfernen. Dadurch konnte bei der späteren Ligation die Rezirkulation des Vektors ohne Fremd-DNS weitgehend unterdrückt werden. Nach weiteren 30 min bei 37°C wurde der Ansatz je 3x abwechselnd mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert, anschließend auf eine Konzentration von 300 mM NaCl ein-

gestellt und mit dem doppelten Volumen an kaltem Äthanol versetzt. Die präzipitierte Plasmid-DNS wurde für 5 min sedimentiert (Eppendorf-Tischzentrifuge), 1x mit 70% Äthanol gewaschen und in 50 µl TE(D) resuspendiert.

2.2.8.2. Präparation chromosomaler DNS-Fragmente

Für die Klonierung wurde gereinigte, RNase-behandelte DNS partiell mit Sau 3A verdaut. Dazu wurden etwa 20 µg chromosomale DNS in einem 300 µl Ansatz mit 5 U Sau 3A versetzt und 1 Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden drei dieser Ansätze vereinigt und in einem 0,3% Agarose-Vertikalgel aufgetrennt. Nach Färben mit Ethidiumbromid wurden unter UV-Bestrahlung Stückchen aus dem Gel herausgeschnitten, die DNS-Fragmente in einer Größe von 9-23 Kilobasen enthielten. Als Größenmarker wurde dabei Hind III geschnittene Lambda-DNS verwendet. Danach wurden die chromosomalen Fragmente in einer Biotrap-Kammer (von Schleicher und Schuell) für 4 Stunden bei 180 V unter Verwendung von Tris-Acetat-Puffer aus den Gelstückchen eluiert, anschließend mit Äthanol gefällt und in 10 µl TE(D) resuspendiert.

2.2.8.3. Ligation des Vektors mit chromosomaler DNS

Für die Ligation wurde der gespaltene, dephosphorylierte Vektor mit den chromosomalen DNS-Fragmenten im Verhältnis 3:1 gemischt. Dabei betrug die Endkonzentration der DNS

etwa 10 bis 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Anschließend wurden die Ligationsansätze (Endvolumen 100 μl) mit H_2O dest. und 10 μl Ligationspuffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 0,1 M MgCl_2) versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und mit 10 μl ATP (10 mM) und 10 μl Dithiothreitol (0,1 M) sowie 1 U T4 DNS-Ligase versetzt. Die Ligationsansätze wurden für 2 bis 3 Tage bei 12°C inkubiert. Anschließend wurden je 50 μl für eine Transformation von E. coli HB 101 eingesetzt. Transformanten wurden auf Selektioplatten (TSA mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin) angereichert und isoliert.

2.2.9. Elution plasmidaler DNS-Fragmente aus Agarose-Gelen

Um bestimmte Plasmid-Fragmente, die durch den Verdau von Plasmid-DNS mit Restriktionsenzymen entstanden sind, direkt aus einem Agarose-Gel zu eluieren, wurde der Restriktionsansatz in einem Agarose-Vertikalgel unter Verwendung von Tris-Acetat-Puffer aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel in Tris-Acetat + 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid angefärbt. Unter UV-Bestrahlung wurde unterhalb der zu eluierenden Bande ein ca. 1 mm hoher Graben, der die Breite der entsprechenden Bande hatte, aus dem Gel ausgehoben. In den Graben wurde 5x Tris-Acetat pipettiert und die Elektrophorese fortgeführt. Dabei wurde alle 2 min der Inhalt des Grabens ausgetauscht. Die eluierte DNS wurde mit Äthanol aus dem Tris-Acetat-Puffer gefällt und in TED aufgenommen.

2.2.10. Herstellung radioaktiv markierter DNS

Für die Filterhybridisierung mit radioaktiver DNS wurde die Sonden-DNS durch Nick-translation mit einem Gemisch aller vier alpha-³²P-markierten Deoxynucleosid-Triphosphate nach der Methode von Rigby et al. (119) markiert. Anschließend wurde die Sonden-DNS durch Äthanolpräzipitation gereinigt.

2.2.11. Herstellung biotinylierter DNS

Für die Filterhybridisierung mit biotinylierter DNS wurde die Sonden-DNS durch Nick-translation mit Bio-11-dCTP (Enzo Biochem) und dem Labeling Kit der Firma Pharmacia nach Vorschrift der Lieferfirma markiert. Auf Filterpapier aufgetropfte, biotinylierte Sonden-DNS war bis zu einer Menge von 4 pg nachweisbar.

2.2.12. Filterhybridisierung mit radioaktiver DNS

Der Transfer von gelelektrophoretisch aufgetrennten DNS-Fragmenten auf Nitrocellulose-Filter, das Waschen und die Autoradiographie des Filters nach der Hybridisierung wurde nach der Methode von Southern (127) durchgeführt. Die Hybridisierung wurde wie von Ott et al. (112) beschrieben durchgeführt.

2.2.13. Filterhybridisierung mit biotinylierter DNS

Für die Filterhybridisierung mit biotinylierter DNS wurde Pst I-geschnittene DNS zunächst gelelektrophoretisch aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert. Danach wurde das Gel zur Trennung der DNS in Einzelstränge in 0,4 N NaOH für 30 min bei RT gebadet und anschließend in 25 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,8) neutralisiert. Danach wurde die DNS für 16 Stunden bei 1A in diesem Puffer auf eine Transfermembran (Gene Screen von NEN) geblotet. Nach Beendigung des Blottens wurde die Membran in Na-Phosphatpuffer für 15 min bei RT gebadet und anschließend luftgetrocknet. Um die unspezifische Bindung von DNS zu minimieren, wurde die Membran in Prähybridisationspuffer unter leichtem Schütteln bei 65° C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die biotinylierte Sonden-DNS, die zuvor mit 1 ml sonikierter Thymus-DNS (5 mg/ml) für 15 min aufgekocht worden war, hinzugefügt und die Hybridisation bei 65° C unter leichtem Schütteln über Nacht durchgeführt. Nach Beendigung der Hybridisation wurde die Membran 2x für 5 min in 2xSSC bei RT gewaschen, anschließend 2x für 15 min in 2xSSC + 1% SDS bei 65° C und danach 2x für 15 min in 0,1xSSC bei RT unter ständigem Schütteln gebadet. Zum Absättigen unspezifischer Avidin-Bindungsstellen wurde die Membran 2x je 15 min bei RT in Blockpuffer unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 60 min bei RT in Komplexpuffer gebadet und anschließend 3x für 5 min mit PBS + 0,5% Tween 20 gewaschen. Zum Entwickeln des

Blots wurde die Membran mit Substratlösung überschichtet.

2.2.14. Markierung plasmidkodierter Proteine im E. coli ----- Minizellsystem -----

Die zu untersuchende Plasmid-DNS wurde zunächst in den Minizellen-produzierenden E. coli Stamm DS 410 transformiert. Von den Transformanten wurde eine Vorkultur in Gegenwart von 50 µg/ml Ampicillin angelegt und damit 800 ml TSB-Medium beimpft. Nach etwa 16 Stunden Inkubation bei 37° C unter Schütteln wurden in einem ersten Zentrifugationsschritt die Maxizellen für 10 min bei 2000 Upm (Beckman-Rotor JA 10) sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand 20 min bei 4° C und 8000 Upm (JA 10) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml kaltem PBS aufgenommen und vorsichtig auf einen 25 ml Sucrosegradienten (10-30%) aufgeschichtet. Die Gradienten wurden in einem Schwenkbecherrotor (Beckman SW 27) für 20 min bei 4° C und 5000 Upm zentrifugiert. Dabei ordneten sich die Minizellen etwa in der Mitte des Gradienten als diffuse Wolke an. Die Wolke wurde abpipettiert, mit kaltem PBS auf ein Volumen von 35 ml aufgefüllt und im Beckman-Rotor JA 20 für 15 min bei 4° C und 15.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert und erneut über einen Sucrosegradienten gereinigt. Anschließend wurden die sedimentierten Minizellen in M9-Medium (86) aufgenommen und bis zu einer OD_{A600} von etwa 0,6 verdünnt. Danach wurden die Zellen in 500 µl-Ansätze portioniert und mit 5 µl Cycloserinlösung (2 mg/ml)

versetzt. Nach 45 min Inkubation bei 37° C wurden entweder 10 µCi eines ¹⁴C-markierten Aminosäuregemischs (Amersham) oder 50 µl methioninfreies Medium + 10 µCi ³⁵S-Methionin (Amersham) hinzugefügt. Nach weiteren 120 min Inkubation bei 37° C wurden die markierten Minizellen durch Zentrifugation in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und in 100 µl H₂O dest. aufgenommen. 10 µl des Ansatzes wurden mit 10 µl 2x Pobenpuffer versetzt, 3 min gekocht und anschließend auf ein 11% Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min in 7% Essigsäure und anschließend für 20 min in Amplify (Amersham) gebadet. Danach wurde das Gel getrocknet und mit einem Röntgenfilm (Fuji RX Safety) kontaktiert. Der Film wurde nach 1 bis 4 Tagen entwickelt.

2.2.15. Isolierung von Fimbrien

Fimbrien wurden nach der Methode von Karch et al. (59) isoliert und gereinigt.

2.2.16. Proteinbestimmung

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Markwell et al. (87) durchgeführt. Als Standard wurde dabei gereinigtes Rinderserumalbumin verwendet.

2.2.17. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die SDS-PAGE wurden 40 - 80 µg Protein lyophilisiert und in 70 µl Probenpuffer für 5 min aufgekocht. Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde ein Größenmarker-Kit der Firma Pharmacia verwendet. Die Elektrophorese wurde nach der Methode von Lugtenberg et al. (84) durchgeführt mit der Veränderung, daß das Trenngel 11% Polyacrylamid enthielt. Die Trennung der Proteine erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 27 mA. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie R250 gefärbt.

2.2.18. Herstellung eines anti-Fimbrien-Antiserums

Zur Immunisierung wurden 0,5 mg gereinigte Fimbrien in 2 ml Kompletten Freund'schen Adjuvans suspendiert und in etwa 10 Depots einem Kaninchen intradermal injiziert. Nach vier Wochen wurde die Immunisierung in gleicher Weise wiederholt. Nach weiteren zwei Wochen wurde das Serum gewonnen und in Aliquots bei -20°C gelagert.

2.2.19. Colony-Blot-Test

Mit PBS angefeuchtete Nitrocellulosescheiben wurden auf Agarplatten mit den zu testenden Kolonien aufgelegt. Nach 30 min bei RT wurde die Nitrocellulose abgenommen und mit PBS + 0,1% Tween 20 für 90 min unter leichtem Schütteln abgesättigt. Anschließend wurde die Nitrocellulose in eine Antiserumverdünnung (1:5000 in PBS + 0,05% Tween 20)

überführt und weitere 90 min unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran 3x für 5 min mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit einem Peroxidase-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IG-Antikörper (Nordic), der 1:2000 in PBS + 0,05% Tween 20 verdünnt worden war, inkubiert. Anschließend wurde die Membran je 1x mit PBS + 0,05% Tween 20, mit PBS und mit TBS für jeweils 5 min gewaschen und danach in Substratlösung gebadet. Die Farbreaktion wurde durch mehrfaches Waschen der Membran mit H_2O dest. gestoppt.

2.2.20. Western-Blot

Gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Methode von Towbin et al. (132) von SDS-Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher und Schuell) übertragen. Der Nachweis von Proteinen mit Antikörpern erfolgte nach der Methode von Karch et al. (60), bzw. wie unter 2.2. 19. beschrieben.

2.2.21. Ganzzell-ELISA

Die Bakterien einer UNK wurden sedimentiert ($2000 \times g$, $10^\circ C$, 10 min), in PBS resuspendiert und auf eine OD_{580} von 0,8 eingestellt. 100 μl dieser Suspension wurden in jedes Depot einer Mikrotiterplatte pipettiert, die Platten 10 min bei 2800 Upm zentrifugiert (Heraeus-Christ Labofuge II) und die sedimentierten Bakterien mit 100 μl 0,5% Glutaraldehyd in

PBS an den Boden der Platte fixiert. Nach 10 min bei RT wurden die Platten 3x mit PBS gewaschen und die freien Proteinbindungsstellen mit 1% BSA in PBS abgesättigt (bei 37° C, 90 min, feuchte Kammer, 200 µl/Depot). Danach wurden die Bakterien mit 50 µl Antiserumverdünnung (in PBS + 0,05% Tween 20) versetzt und weitere 60 min bei 37° C in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3x mit PBS + 0,05% Tween 20 gewaschen und für 60 min mit 50 µl eines Peroxidase-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IG-Antikörpers (1:1000 in PBS + 1% BSA + 0,05% Tween 20) inkubiert. Die Platten wurden 3x mit PBS/Tween gewaschen und gebundene Antikörper durch eine Farb-reaktion mit 200 µl Substratlösung (bei RT im Dunkeln) nachgewiesen. Nach 30 min wurden je 100 µl Substratlösung in eine neue Mikrotiterplatte überführt und die Farbin-tensität bei einer OD₄₅₀ im Photometer (Dynatech) bestimmt.

2.2.22. ELISA mit gereinigten Fimbrien

200 µl Fimbrienlösung (3 µg/ml in 0,2 M Na-Carbonatpuffer pH 9,6) wurden in jedes Depot einer Mikrotiterplatte pi-pettiert und 2 Stunden bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Absättigung der freien Proteinbindungsstel-len, die Reaktion mit anti-Fimbrien-Antiserum und der Nachweis gebundener Antikörper mit dem Peroxidase-markier-ten Ziege-anti-Kaninchen-IG-Antikörper erfolgte wie unter 2.2.21. beschrieben. Im Gegensatz zum Ganzzell-ELISA wur-den im ELISA mit gereinigten Fimbrien keine neuen Mikroti-

terplatten zum Messen der Farbreaktion verwendet.

2.2.23. Indirekte Immunfluoreszenz mit Bakterien

Die Bakterien aus 5 ml UNK wurden sedimentiert (2000 x g, 10 min, 4° C) in PBS gewaschen und anschließend in 5 ml PBS resuspendiert. 25 µl dieser Suspension wurden auf entfetteten Objektträgern 10 min bei RT inkubiert und danach mit 25 µl 0,5% Glutaraldehyd in PBS übertropft. Nach 10 min Fixierung bei RT wurden die Objektträger 1x mit PBS gewaschen und die freien Proteinbindungsstellen mit 50 µl 1% BSA in PBS abgesättigt. Nach 30 min bei RT wurden die Bakterien mit 50 µl einer anti-Fimbrien-Antiserumverdünnung (in PBS + 0,05% Tween 20) inkubiert (30 min, feuchte Kammer, 37° C), 3x mit PBS/Tween gewaschen und anschließend mit 50 µl eines FITC-markierten Ziege-anti-Kaninchen-IG-Antikörpers versetzt. Nach 30 min bei 37° C in der feuchten Kammer wurden die Objektträger mit PBS/Tween gewaschen und mit einem Puffer, der vorzeitiges Ausbleichen der Präparate verhindert, eingedeckelt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Typ BH T) der Firma Olympus. Dieses Mikroskop war mit einem Fluoreszenz-Auflicht-Illuminator (Modell: BH-RFL-W) sowie mit einer photographischen Einrichtung (Modell: PM-10AD) ausgerüstet.

2.2.24. Elektronenmikroskopie

Die Bakterien einer ÜNK wurden sedimentiert (2000 x g, 10 min, 4° C) in PBS resuspendiert und auf eine Zellzahl von 1×10^9 Keimen/ml mit einer Neubauer-Zählkammer eingestellt. 5 µl dieser Suspension wurden auf Formvar-beschichtete Elektronennetze (200 mesh, Balzers, Wiesbaden) aufgebracht und 10 min inkubiert. Danach wurde der Überstand mit Filterpapier abgesaugt und die Keime 1,5 min mit 1% Uranylacetat kontrastiert, 3x 30 sec mit H₂O dest. gewaschen und luftgetrocknet. Die Präparate wurden in einem Elektronenmikroskop der Firma Zeiss untersucht.

2.2.25. Bakterienadhärenz an Nierengewebsschnitte

Die Adhärenz von Bakterien an Nierengewebsschnitte wurde, wie von Korhonen et al. (70) beschrieben, untersucht. Dazu wurden zunächst 8×10^8 Bakterien für 30 min bei RT in 2 ml 0,1 M Na₂CO₃ pH 9,0 + 0,9% (wt/vol) NaCl und 75 µg/ml FITC inkubiert. Danach wurde die Suspension mit PBS + 0,05% Tween 20 auf 20 ml aufgefüllt. Die Bakterien wurden sedimentiert (s.o.), 1x mit 20 ml PBS/Tween gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Die markierten Bakterien wurden in 100 µl Aliquots bei -20°C gelagert. Für den Adhärenztest wurden die markierten Bakterien in PBS + 0,01% Tween 20 und 50 mM Sialinsäure und Lactose (pH 7,1) bis zu einer Keimzahl von 2×10^8 bis 1×10^{10} Bakterien/ml verdünnt. 50 µl dieser Suspension wurden auf 7 µm dicke Nierengewebsschnit-

te, die zuvor mit 0,25% Glutaraldehyd in PBS an entfettete Objektträger fixiert worden waren, pipettiert. Die Ansätze wurden 20 min bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert, 3x mit PBS gewaschen und mit Eindeckpuffer für die Immunfluoreszenz eingedeckelt. Anschließend wurden die Präparate im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.26. Adhärenz von Bakterien an Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (P 388D1 und HeLa) wurden in DMEM + 10% FCS bei 37° C und 8% CO₂ in Zellkulturflaschen inkubiert. Für den Adhärenztest wurden die Zellen vom Boden der Flaschen abgespült, sedimentiert (800 x g, 10 min) und in frischem Medium auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml dieser Suspension wurde in Leighton-Röhrchen, die entfettete Glasplättchen enthielten, überführt und 20 Stunden bei 37° C und 8% CO₂ inkubiert. Während dieser Zeit adhärten die Zellen an die in den Röhrchen befindlichen Glasplättchen. Danach wurde das Medium dekantiert und die Zellen mit DPBS (Biochrom, Berlin) gewaschen. Anschließend wurden die Röhrchen mit 1 ml Bakteriensuspension ($2-4 \times 10^8$ Keime/ml DPBS) versetzt, 20 min bei 37° C inkubiert und danach 3x mit DPBS gewaschen. Die Glasplättchen wurden aus den Röhrchen entfernt, mit Vitro clud auf Objektträger aufgeklebt und mit Wright's Färbelösung (Sigma) gefärbt. Zur Auswertung wurden die Präparate mit Vitro clud eingedeckelt und im Lichtmikroskop untersucht.

2.2.27. Adhärenz von Bakterien an humane polymorphkernige

Leukozyten

Um die Adhärenz von Bakterien an humane polymorphkernige Leukozyten (PMN's) zu testen, wurde zunächst 1 ml heparinisiertes Blut auf Dichtegradienten (91 mg Amipaque (Scheering) in 100 µl Aqua dest. + 3,34 ml Lymphoflot (Biotest) pH 7,2) aufgeschichtet und 90 min bei 4°C inkubiert. Während dieser Zeit sedimentierten die Erythrozyten auf den Boden des Reagenzröhrchens, während die restlichen Blutbestandteile auf dem Gradienten liegen blieben. Anschließend wurde 1 ml 20% Humanserumalbumin in PBS aufgeschichtet. Dabei ordnete sich das Albumin über dem Gradienten zwischen den Granulozyten ("weißer Ring", untere Phase) und den Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten (obere Phase) an. Die Granulozyten wurden abpipettiert, sedimentiert (800 x g, 10 min) und zur Lyse der restlichen Erythrozyten in 1 ml Aqua dest. resuspendiert. Nach 15 sec wurde die Isotonie durch Zugabe von 10 ml PBS wiederhergestellt. Die Zellen wurden erneut sedimentiert (s.o.), in DPBS resuspendiert und auf eine Dichte von 4×10^5 Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Suspension wurden mit 100 µl Bakteriensuspension ($1-4 \times 10^7$ Keime/ml DPBS) gemischt, 20 min bei 37°C unter Rotation inkubiert und anschließend bei 800 Upm für 10 min auf Objektträger aufzentrifugiert (Cytospin 2, von Shandon). Die Präparate wurden mit Wright's Färbelösung gefärbt und im Lichtmikroskop ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Beteiligung von Plasmiden an der Expression von Fimbrien

3.1.1. Darstellung der Plasmide der Blutkultur-Isolate

Für E. coli Stämme verschiedener Wirkungstypen (enterohämorrhagische, enteropathogene) konnte gezeigt werden, daß diese Keime über charakteristische Plasmide verfügen, die für die Fimbrien dieser Bakterien kodieren (61). Um zu überprüfen, ob die Fimbrien der für diese Arbeit ausgewählten Blutkultur-Isolate ebenfalls von einem gemeinsamen Plasmid kodiert werden, wurden die Stämme zunächst auf die Anwesenheit extrachromosomaler DNS untersucht. Dabei zeigte sich, daß von den zehn untersuchten Stämmen nur sechs Stämme Plasmide enthielten. Die Plasmide waren alle von unterschiedlicher Größe und hatten Molekulargewichte zwischen 2,4 und etwa 250 Megadalton (Abb. 4).

Um zu überprüfen, ob zumindest bei den plasmidhaltigen Stämmen die extrachromosomale DNS für die Expression von Fimbrien verantwortlich ist, sollten die Plasmide in einen fimbrienlosen Laborstamm transformiert werden. Als Selektionsmarker sollten dazu die Plasmide durch die Insertion eines für Ampicillinresistenz kodierenden Transposons markiert werden.

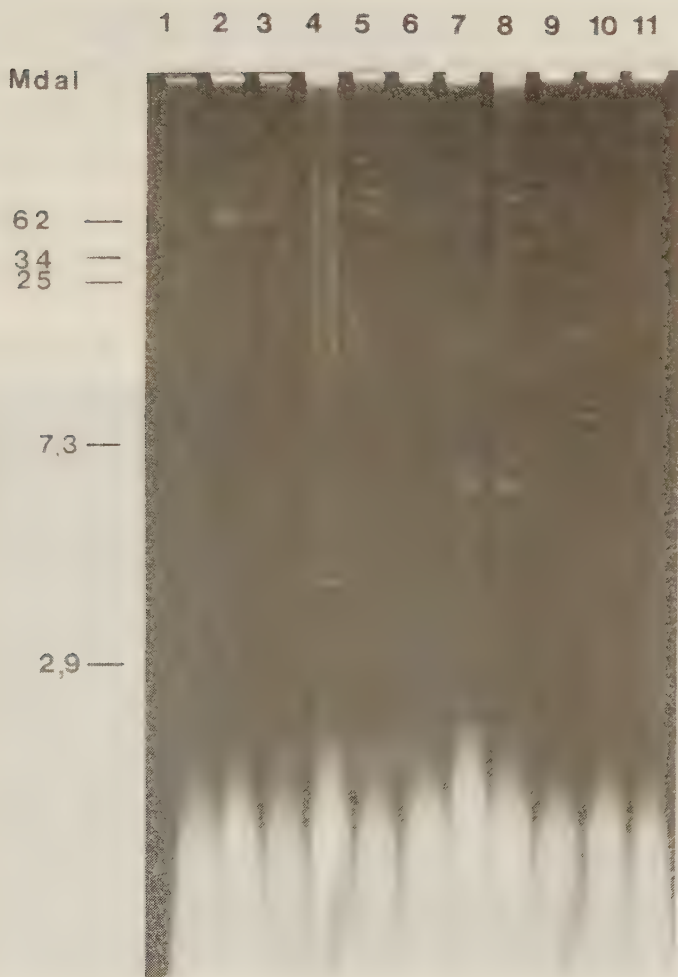


Abb. 4: Darstellung der Plasmide (0,7% Agarose-Gel) aus den E. coli Stämmen BK 595 (2), BK 658 (3), BK 797 (4), BK 1001 (5), BK 1034 (6), BK 1361 (7), BK 1369 (8), BK 740 (9), BK 944 (10) und BK 1454 (11). Bande (1) enthält Größenmarkerplasmide.

3.1.2. Transposonmutagenese und Transformation

Im ersten Schritt der Transposonmutagenese wurde durch Konjugation ein Transposon-tragendes Plasmid (pMR5) in die Blutkultur-Isolate eingebracht und der Erfolg der Plasmidübertragung im Agarosegel überprüft (Abb. 5). Es zeigte sich, daß alle Transkonjuganten neben den wirts-eigenen Plasmiden auch daß pMR5-Plasmid enthielten.

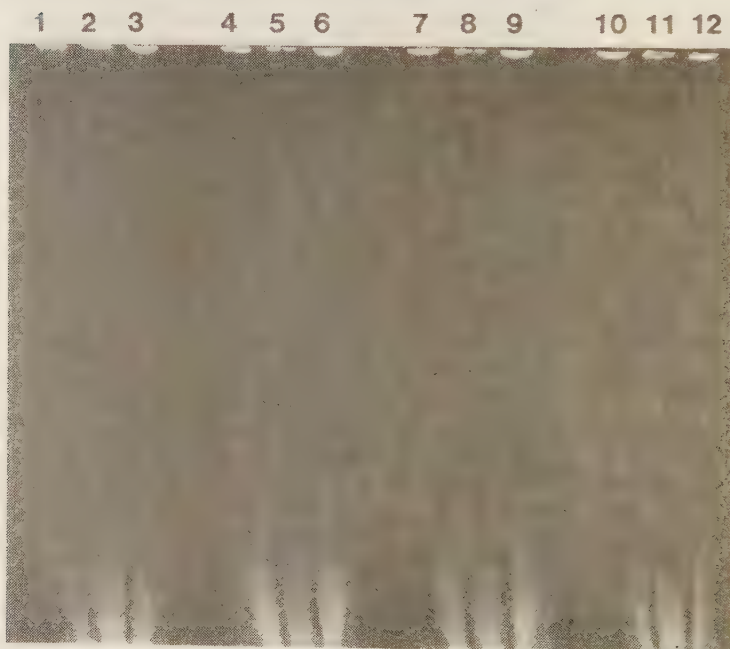


Abb. 5: Plasmidisolierung aus BK 595 (1), C 600pMR5 (2), BK 595pMR5 (3), BK 1369 (4), C 600pMR5 (5), BK 1369pMR5 (6), BK 1001 (7), C 600pMR5 (8), BK 1001 pMR5 (9), BK 1034 (10), C 600pMR5 (11), BK 1034 pMR5 (12).

Bei zwei der Blutkultur-Isolate konnten keine Transkonjuganten angezüchtet werden. Möglicherweise enthalten diese Stämme Plasmide, die zur gleichen Inkompatibilitätsgruppe gehören wie das Plasmid pMR5 und so dessen Replikation verhindern.

Von allen Transkonjuganten konnten nach Bebrütung bei 42° C Transposonmutanten selektioniert werden. Mit Ausnahme des etwa 250 Megadalton großen Plasmides des Stammes BK 1001 ließen sich alle Plasmide der Transposonmutanten in den Laborstamm E. coli HB 101 transformieren.

In den Abbildungen 6 und 7 ist der Ablauf der Transposonmutagenese und die anschließende Transformation der markierten Plasmide am Beispiel des Stammes BK 595 dargestellt.



Abb. 6: Plasmidisolierung aus den Stämmen BK 595 (1), C 600pMR5 (2), BK 595 pMR5 83), und der Transposonmutante BK 595/1 (4).

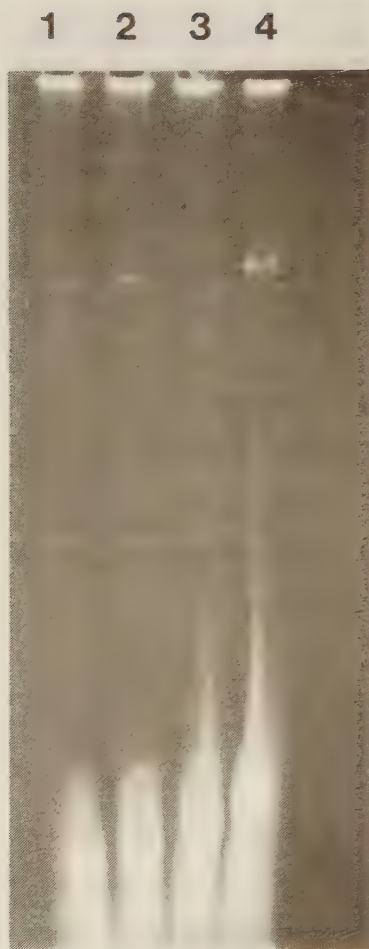


Abb. 7: Plasmidisolierung aus den Stämmen BK 595 (1), BK 595/1 (2), HB 101 (3) und der Transformante 595/1-1 (4).

3.1.3. Überprüfung der Fimbrienexpression bei Transformanten

Zur Beantwortung der Frage, ob die Plasmide der Blutkultur-Isolate für Fimbrien kodieren, wurden die Transformanten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Fimbrien zu exprimieren, untersucht. Als Kontrolle wurden neben den Wildstämmen auch die Transposonmutanten, deren Plasmide für die Transformation verwendet wurden, mitgetestet. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß ein Fimbriengen durch die Insertion des Transposons ausgeschaltet war. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Es zeigte sich, daß alle untersuchten Wildtypen und Transposonmutanten in der Lage waren, Fimbrien zu bilden. Im Gegensatz dazu waren derartige Strukturen bei keiner der untersuchten Transformanten nachweisbar.

Diese Befunde machen damit deutlich, daß keines der untersuchten Plasmide für die Expression von Fimbrien verantwortlich ist.

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die Expression der Fimbrien daher auf chromosomaler Ebene untersucht werden. Dazu sollte die chromosomale DNS eines Blutkultur-Isolates gereinigt und in den Laborstamm HB 101 kloniert werden.

Tabelle 4: Überprüfung der Fimbrienexpression

Stamm	Charakterisierung	Fimbrien
HB 101	Laborstamm	-

BK 595	Wildtyp	+
BK 595/1	Transposonmutante	+
595/1-1	Transformante	-

BK 1001	Wildtyp	+
BK 1001/7	Transposonmutante	+
1001/7-9	Transformante	-

BK 1034	Wildtyp	+
BK 1034/5	Transposonmutante	+
1034/5-1	Transformante	-

BK 1369	Wildtyp	+
BK 1369/1	Transposonmutante	+
BK 1369/4	Transposonmutante	+
1369/1-2	Transformante mit großem Plasmid	-
1369/4-1	Transformante mit kleinem Plasmid	-

3.2. Klonierung der chromosomalen DNS eines Blutkultur- ----- Isolates -----

Für diese Versuche wurde der Stamm BK 658 verwendet, da dieser Keim aufgrund von früheren Untersuchungen zum Fimbrienbesatz besonders interessant erschien. BK 658 exprimiert neben Typ 1A und Typ 1B Fimbrien noch einen dritten Fimbrientyp, der mit anti-S-Fimbrienantiserum kreuzreagiert. Der Stamm zeigt jedoch nicht die für S-Fimbrien typische Agglutination von Rindererythrozyten.

Chromosomale DNS-Fragmente des Stammes BK 658 wurden in die Bam HI-Schnittstelle des Plasmidvektors pBR 322 ligiert und die Plasmide anschließend in E. coli HB 101 transformiert. Transformanten, die nach Selektion auf Ampicillin-haltigem Nährmedium angezüchtet werden konnten, wurden im Colony-Blot-Test auf ihre Expression von Fimbrien untersucht. Dabei wurde ein Antiserum verwendet, das gegen gereinigte Fimbrien des Stammes BK 658 gerichtet war. Dadurch war die Möglichkeit gegeben, alle Fimbrientypen, die vom Wildtyp gebildet werden (1A, 1B, S-ähnlich), auf den Transformanten identifizieren zu können.

Bei dem Suchtest konnte eine Kolonie identifiziert werden, die eine deutliche Reaktion mit dem anti-Fimbrien-Antiserum zeigte. Um die Fimbrienbildung der Transformante zu überprüfen, wurde der Keim zunächst im Elektronenmikroskop untersucht und mit dem Wildtyp BK 658 sowie dem Laborstamm

HB 101 verglichen. Während der Wildtyp deutlich sichtbare Fimbrien und Flagellen exprimiert, waren derartige Strukturen auf dem Laborstamm nicht nachweisbar (Abb. 8 a und b). Demgegenüber zeigte die Transformante HB 101/658-6 eine deutliche Fimbrienbildung (Abb. 8 c). Dabei betrug die Länge der Fimbrien etwa $1,2\text{ }\mu\text{m}$ und der Durchmesser etwa 7 nm .

Um die klonierten Fimbrien einem bestimmten Typ zuzuordnen, bzw. um diese Strukturen näher zu charakterisieren, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die funktionellen, physikochemischen und serologischen Eigenschaften dieses Fimbrientyps analysiert.

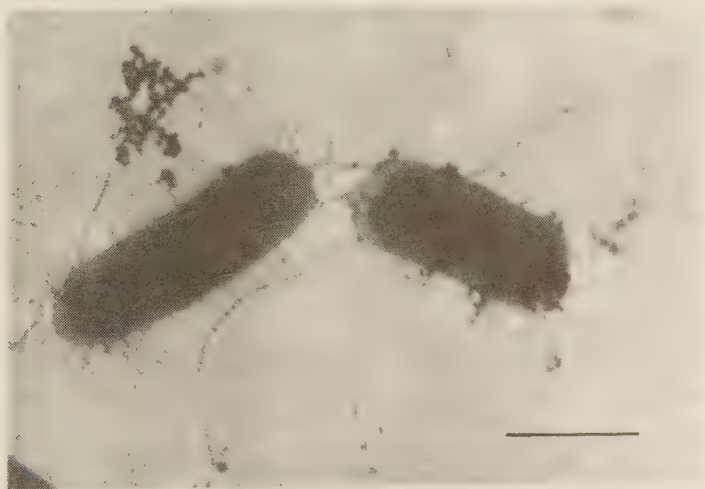


Abb. 8a: BK 658, Vergrößerung 24.000x. Der Balken entspricht $1\text{ }\mu\text{m}$.



Abb. 8b: HB 101, Vergrößerung wie in 8a.



Abb. 8c: HB 101/658-6, Vergrößerung wie in 8a.

3.3. Typisierung der klonierten Fimbrien

3.3.1. Funktionelle Charakterisierung durch Agglutination

Fimbrien lassen sich aufgrund ihrer Fähigkeit, Erythrozyten verschiedener Tierspezies zu agglutinieren, in verschiedene Typen bzw. Gruppen einteilen. So ist für Typ F1A Fimbrien die Mannose sensible Agglutination von Meerschweinchenerythrozyten charakteristisch, während S-Fimbrien eine Mannose resistente, Neuraminidase sensible Agglutination von Rindererythrozyten bewirken (24, 114). Um festzustellen, ob die klonierten Fimbrien sich funktionell einem bekannten Typ zuordnen lassen, wurden die Bakterien mit Erythrozyten verschiedener Spezies inkubiert. Als Vergleich wurden das Blutkultur-Isolat BK 658 sowie der Stamm HB 101 mitgetestet (Tabelle 5).

Tab. 5: Agglutination der Bakterienstämme mit verschiedenen Erythrozyten

Stamm	Mensch	Erythrozyten von		Rind
		Meerschwein	Huhn	
BK 658	MS	MS	MS	-
HB 101	-	-	-	-
HB 101/658-6	-	-	-	-

MS Mannose sensitive, - keine Agglutination

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, bewirkt der Wildtyp BK 658 eine Mannose sensitive Agglutination der Erythro-

zyten von Mensch, Meerschwein und Huhn. Dieser Agglutinationstyp wird durch die F1A Fimbrien dieses Keimes hervorgerufen. Im Gegensatz dazu zeigen sowohl der Laborstamm HB 101 als auch die Transformante keine Agglutinationseigenschaften. Mit Hilfe der Hämagglutination lassen sich daher die klonierten Fimbrien keinem bestimmten Typ zuordnen.

3.3.2. Gelelektrophoretische Charakterisierung

Die Gelelektrophorese bietet nicht nur die Möglichkeit, das Molekulargewicht von Fimbrienuntereinheiten zu bestimmen. Vielmehr lassen sich mit dieser Methode auch physikochemische Eigenschaften von Fimbrien analysieren. Darunter versteht man z.B. die Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Detergentien wie SDS, Harnstoff und Guanidinhydrochlorid. Für F1A Fimbrien ist bekannt, daß dieser Typ resistent ist gegenüber der Denaturierung mit SDS. Um die Fimbrien in ihre Untereinheiten zu dissoziieren, d.h. um sie gelelektrophoretisch darstellen zu können, müssen Typ F1A Fimbrien mit Harnstoff oder Guanidinhydrochlorid vorbehandelt werden (28). Im Gegensatz dazu reicht bei Typ F1B oder S-Fimbrien zur Denaturierung ein Aufkochen in SDS aus. Zur weiteren Charakterisierung wurden die klonierten Fimbrien deshalb zunächst isoliert und anschließend gelelektrophoretisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese Fimbrien als eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von 17 K in das SDS-Gel eindringen (Abb. 9). Für die Solu-

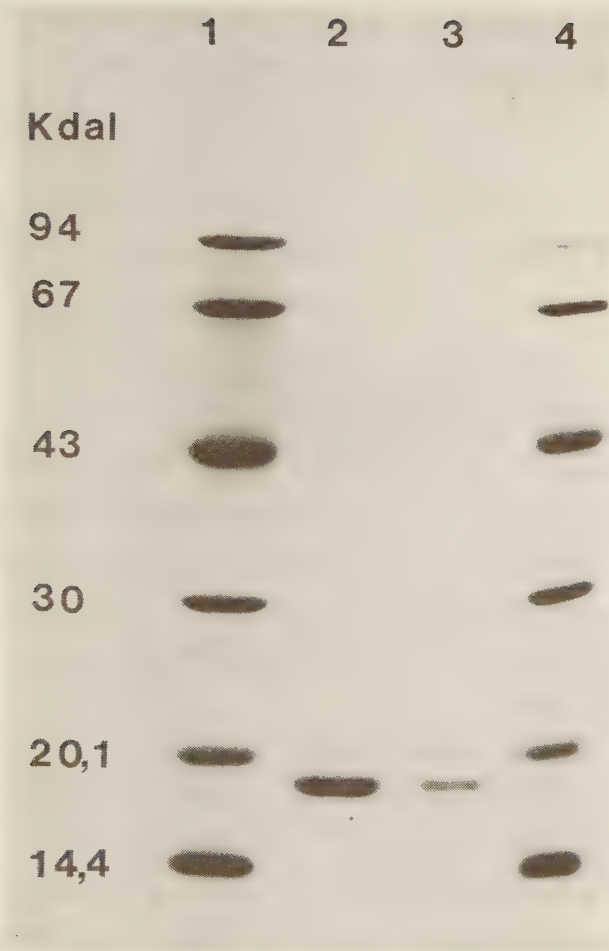


Abb. 9: SDS-PAGE mit Fimbrien der Transformante HB 101/658-6 (2) und des Wildtyps BK 658 (3). In den Banden 1 und 2 sind Standardproteine dargestellt.

bilisierung der Fimbrien reichte ein Aufkochen in Gegenwart von 2% SDS aus. Eine Behandlung mit Guanidinhydrochlorid war nicht notwendig. Bei gleicher eingesetzter Proteinmenge ist die Fimbrienbande des Wildtyps im Gel wesentlich dünner. Offensichtlich exprimiert BK 658 zu einem großen Teil Typ 1A Fimbrien, die nach der SDS-Behandlung nicht in das Gel eindringen konnten. Das Ergebnis macht deutlich, daß die Fimbrien der Transformante HB 101/658-6 hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften keine Ähnlichkeit mit Typ 1A Fimbrien haben.

3.3.3. Immunologische Charakterisierung

Fimbrien reagieren mit entsprechenden Antiseren in Form einer Ag-Ak-Reaktion, die sich in verschiedenen Testsystemen nachweisen läßt. Eine weitere Möglichkeit, Fimbrien näher zu charakterisieren ist es **daher**, ihre Reaktion mit Antiseren, die gegen definierte Fimbrientypen gerichtet sind, zu testen.

Für den Wildtyp BK 658 war bekannt, daß er zum einen mit Antiserum gegen F1A und F1B Fimbrien reagiert (I. und F. Ørskov, persönliche Mitteilung). Weiterhin war eine schwache Reaktion mit einem Antiserum, das gegen S-Fimbrien gerichtet ist, nachweisbar. Tests mit Fimbrien des Stammes HB 101/658-6 zeigten weder eine Reaktion mit anti-F1A noch mit anti-F1B-Antiserum (I. und F. Ørskov). Im Gegensatz dazu war jedoch im Immunoblot eine Reaktion mit Antiserum gegen S-Fimbrien feststellbar (Abb.10). Die Reaktion war

jedoch im Vergleich zu der Reaktion des Antiserums mit den homologen Fimbrien deutlich geringer. Dagegen war mit Antiserum, das gegen die klonierten Fimbrien gerichtet ist, keinerlei Kreuzreaktion mit S-Fimbrien nachweisbar. Dies zeigte sich nicht nur mit denaturierten Fimbrienuntereinheiten im Immunoblot (Abb. 10), sondern auch mit nativen Fimbrien im ELISA (Abb. 11).

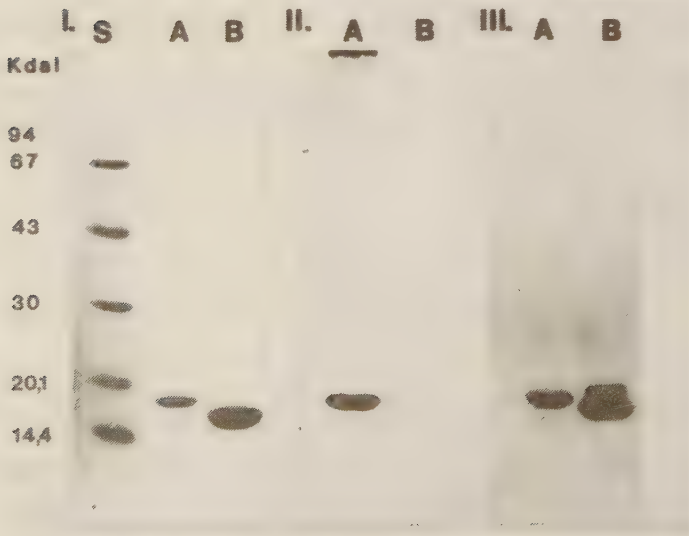


Abb. 10: I, SDS-PAGE, in Bande S sind Standardproteine dargestellt, in Bande A die klonierten Fimbrien und in Bande B S-Fimbrien. II und III sind Immunoblots der Fimbrienbanden aus I. Blot II wurde mit Antiserum, das gegen die klonierten Fimbrien gerichtet ist, entwickelt. Blot III wurde mit anti-S-Fimbrienantiserum entwickelt.

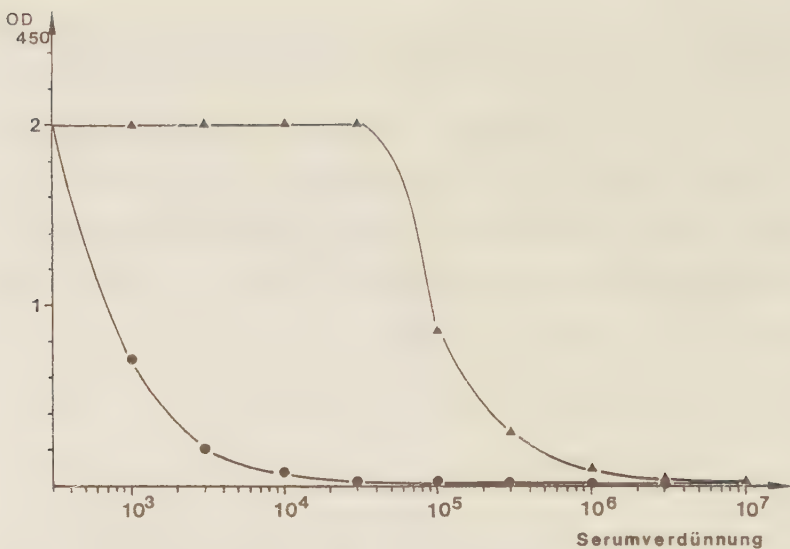


Abb. 11a: Reaktion des Antiserums gegen die klonierten Fimbrien mit gereinigten Fimbrien der Transformante (▲) und mit S-Fimbrien (●).

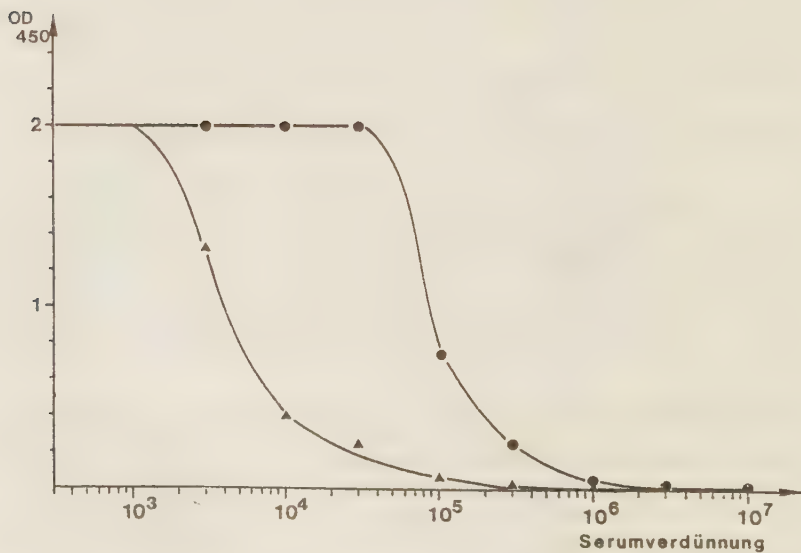


Abb. 11b: Reaktion von anti-S-Fimbrienantiserum mit gereinigten Fimbrien der Transformante (▲) und mit S-Fimbrien (●).

Die dargestellten Versuchsergebnisse machen damit deutlich, daß die klonierten Fimbrien serologisch zwar verwandt, aber nicht identisch mit bisher bekannten S-Fimbrien sind.

3.3.4. Genetische Charakterisierung

Die Verwandtschaft von Proteinen läßt sich nicht nur auf serologischer, sondern auch auf genetischer Ebene feststellen. Dabei zeigt sich der Verwandtschaftsgrad im Ausmaß homologer Basensequenzen in der DNS. Solche homologen Sequenzen spiegeln sich z.B. in ähnlichen Restriktionsmustern der untersuchten Gene wider. Eine andere Methode stellt die DNS-Hybridisierung dar, bei der die Gene der entsprechenden Proteine miteinander hybridisiert werden. Beide Methoden wurden im folgenden angewandt, um die klonierten Fimbrien genetisch zu charakterisieren, und um ihre Verwandtschaft mit S-Fimbrien zu untersuchen.

3.3.4.1. Restriktionsanalyse des klonierten DNS-Fragments

Eine Restriktionskarte gibt die Stellen im Gen an, an denen bestimmte Restriktionsenzyme (Restriktionsnucleasen) den DNS-Doppelstrang zerschneiden. Dabei hat jedes Restriktionsenzym eine ganz charakteristische Basensequenz, die es in der DNS erkennt. Gleiche Restriktionsmuster bedeuten demnach, zumindest im Bereich der Schnittstellen, identische Basensequenzen. Um eine Restriktionskarte für das re-

kombinente Plasmid (bezeichnet mit pBR658-6) der Transformante HB 101/658-6 zu erstellen, wurde das gereinigte Plasmid zunächst mit den Restriktionsenzymen Eco RI, Eco RV Cla I, Pst I und Sph I geschnitten. Die dabei entstandenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abbildung 12).

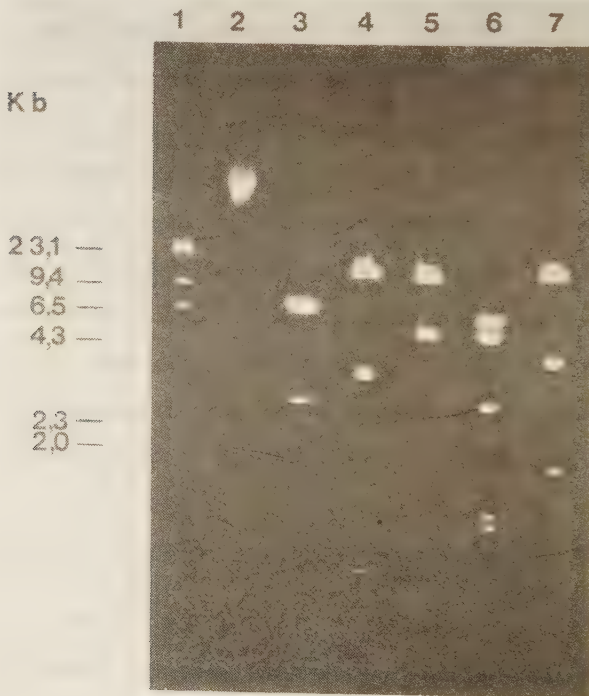


Abb 12: 1% DNS-Agarosegel. Bande (1) Lambda-DNS Hin III geschnitten. Bande (2) pBR658-8 ungeschnitten. Bande (3) bis (4) pBR658-6 geschnitten mit Eco RI (3), Eco RV (4), Cla I (5), Pst I (6) und Sph I (7).

An Hand des Markers (siehe auch Abbildung 13) ließen sich anschließend die Größen der einzelnen Fragmente bestimmen (Tabelle 6).

Tab. 6: Größe der DNS-Fragmente (Kb) nach Behandlung von pBR 658-8 mit Restriktionsenzymen

Eco RI	Eco RV	Cla I	Pst I	Sph I
7,2	13,0	12,2	6,3	11,8
2,8	3,4	5,0	4,9	3,6
	1,06		2,6	1,7
	0,75		1,4	
			1,3	
			0,7	

Aus Tabelle 6 ist ersichtlich, daß das rekombinente Plasmid eine Größe von 17,2 Kilobasen (Kb) hat. Da auf den Vektor ca. 4,3 Kb entfallen, resultiert daraus für das klonierte DNS-Fragment eine Größe von 12,9 Kb. Das Plasmid pBR658-6 wurde von Eco RI in zwei 7,2 Kb und ein 2,8 Kb Fragment geschnitten. Dem entsprechen drei Schnittstellen, von denen eine im Vektor und zwei im Insert liegen. Eco RV erkennt ebenso wie Cla I, Pst I und Sph I eine Schnittstelle im Vektor. Eco RV schneidet weiterhin das Insert dreimal, während Cla I nur eine Erkennungssequenz im klonierten Fragment hat. Pst I hat fünf und Sph I zwei Schnittstellen im Insert. Weitere Analysen mit Bam HI, Sal I und Hind III ergaben, daß das Fragment keine Erken-

nungssequenzen für diese Enzyme aufweist.

Mit Hilfe geeigneter Doppelverdauungen, d.h. kombinierter Verdauungen mit jeweils zwei Restriktionsenzymen (Abb. 13) ließ sich die Lage der in Tabelle 6 aufgeführten DNS-Fragmente im Gen bestimmen. Gleichzeitig wurden damit die Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme lokalisiert. In Abbildung 13 ist die Restriktionskarte des klonierten DNS-Fragments für die oben angegebenen Enzyme dargestellt und der S-Fimbriendeterminante (sfa-Determinante) gegenübergestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß Pst I die sfa-Determinante in sechs Fragmente schneidet, die mit P5, P9, P8, P11, P12 und P4 bezeichnet worden sind (38). Ein weiteres Fragment, P10, liegt oberhalb der Fimbriengene in der Randregion. Im Gegensatz dazu wird die 658-6 Sequenz (klonierte, chromosomale DNS ohne Vektor) nur in vier Fragmente zerschnitten, die in der Größe etwa den Stückchen P5, P9, P8 und P11 entsprechen. Die Fragmente P12 und P4 fehlen bei 658-6. Rechts und links der beschriebenen P-Stückchen befinden sich in beiden Determinanten noch Gensequenzen, die mit dem Vektor assoziiert sind. Da diese Enden unterschiedlich lang sind, wurden in der Abbildung zum besseren Vergleich die Determinanten so dargestellt, daß sich in der Größe entsprechende Pst I-Fragmente gegenüberliegen.

Das Restriktionsenzym Eco RI schneidet beide Determinanten

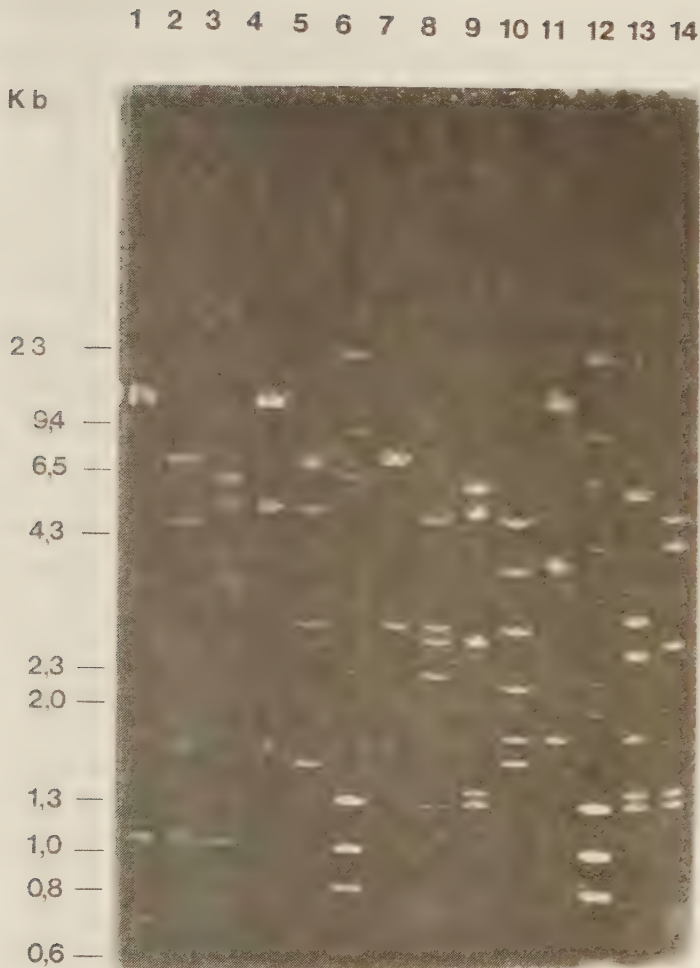
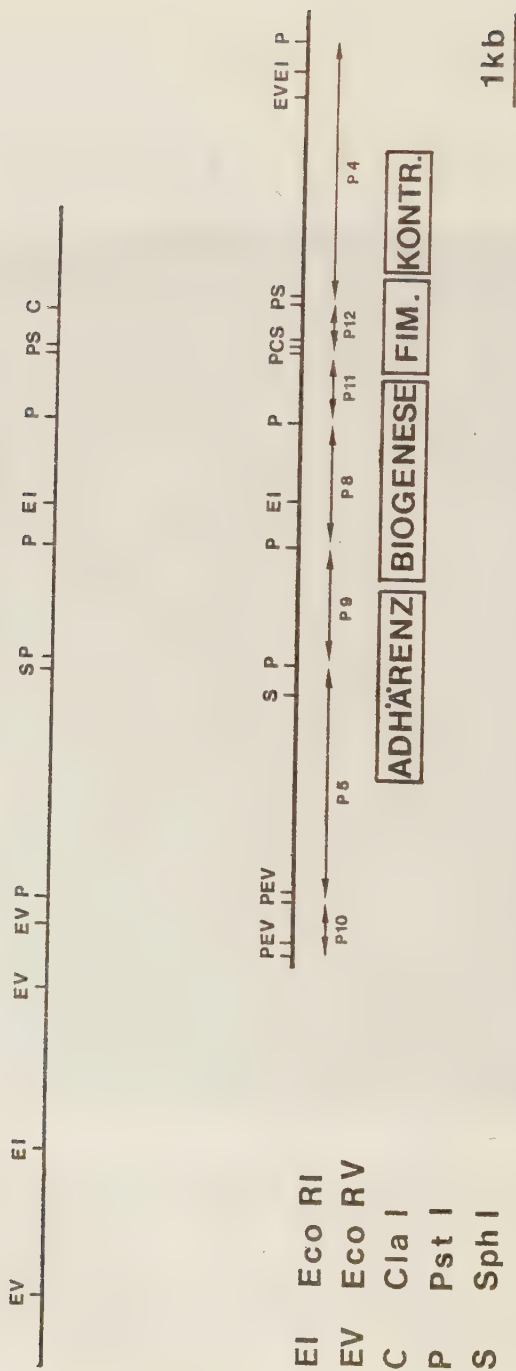


Abb. 13: Gelelektrophoretische Auftrennung der Plasmid-DNS-Fragmente nach Restriktionsenzymsspaltung mit Eco RV (1), Eco RV/Eco RI (2), Eco RV/Cla I (3), Cla I (4), Eco RI/Cla I (5), Eco RI (7), Eco RI/Pst I (8), Pst I (9), Eco RI/Sph I (10), Sph I (11), Pst I/Sph I (13), Pst I/Cla I (14). In den Banden 6 und 12 sind Größenmarkerfragmente (DRigest III, von Pharmacia) dargestellt.



El	Eco RI
EV	Eco RV
C	Cla I
P	Pst I
S	Sph I

Diagram of a linear chromosome with various bands labeled. From left to right: PEV PEV, S P, P EI, P, PCS PS, EVEI P. Above the chromosome, labels in boxes indicate regions: ADH^A RENZ (above S P), BIOGENESE (above P EI), FIM. (above P), and KONTR. (above PCS PS). Below the chromosome, labels P 4, P 12, P 11, P 8, P 9, P 5, and P 10 are placed near specific bands.

ADHÄRENZ BIOGENESE FIM. KONTR.

1 kb

Abb. 14: Restriktionskarte des klonierten, chromosomalen DNS-Fragments 658-6 (oben) und der sfa-Determinante (unten). Die Restriktionskarte für die sfa-Determinante wurde von Dr. Hacker zur Verfügung gestellt.

etwa an gleicher Stelle im P8-Fragment. Zusätzlich findet sich bei 658-6 noch eine weitere Schnittstelle im längeren 5'-terminalen Ende, während in der sfa-Determinante noch eine Schnittstelle im längeren 3'-terminalen Ende lokalisiert ist.

Eco RV schneidet die 658-6-Sequenz nur oberhalb der P-Fragmente, während in der sfa-Determinante eine der Schnittstellen zum 3'-terminalen Ende in das P5-Fragment verschoben ist. Zusätzlich befindet sich noch je eine weitere Schnittstelle im längeren 5'- bzw. 3'-terminalen Ende beider DNS-Stückchen.

Cla I schneidet beide DNS-Sequenzen nur einmal. Dabei ist die Schnittstelle in beiden Determinanten etwa an gleicher Stelle etwas unterhalb von P11 lokalisiert.

Das Enzym Sph I schneidet beide Fimbriendeterminanten etwa an gleicher Stelle im P5-Fragment. Weiterhin befinden sich in 658-6 noch eine und in der sfa-Determinante noch zwei Schnittstellen unterhalb von P11.

3.3.4.2. Hybridisierung mit der sfa-Genprobe

Um die Verwandtschaft der klonierten Fimbrien mit S-Fimbrien näher zu untersuchen, wurde Pst I geschnittene, chromosomale DNS des Wildtyps BK 658 und Pst I-geschnittene pBR 658-6-DNS mit einer radioaktiv markierten sfa-Genprobe

(Eco RV-Fragment) im Southernblot hybridisiert. Als Kontrolle wurde die unmarkierte, Pst I-geschnittene sfa-Genprobe mitgetestet (Abb. 15).

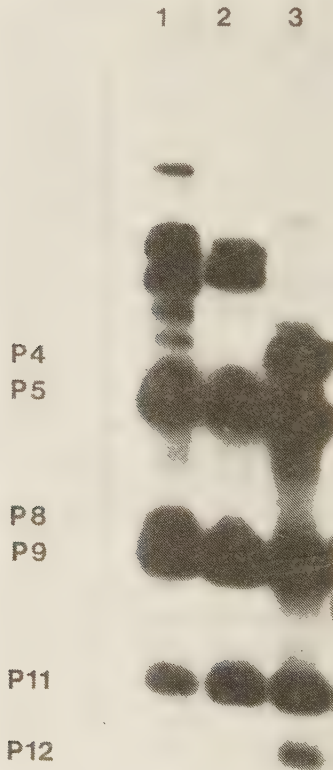


Abb. 15: Southern-Hybridisierungsmuster Pst I geschnittener DNS des Wildtyps (1), des rekombinanten Plasmids pBR658-6 (2) und des Plasmids pANN801-13, das die klonierte sfa-Determinante enthält (3).

Es zeigte sich, daß die radioaktive Genprobe sowohl an die Fragmente P5, P8, P9 und P11 der homologen Determinante als auch an Fragmente entsprechender Größe in der chromosomalen DNS des Wildtyps und in der pBR658-6-DNS bindet. Darüber hinaus bindet die Genprobe noch an die Fragmente P12 und P4 der sfa-Determinante. Derartige Fragmente stellen sich in der DNS des Blutkultur-Isolates bzw. im Plasmid pBR658-6 nicht dar. Die schwache Reaktion im P4-Bereich bei der BK 658 DNS ist auf eine Kreuzreaktion des Kontrollbereichs der S-Fimbriendeterminante mit Typ 1 Fimbrien zurückzuführen. Statt der Fragmente P12 und P4 zeigt sich bei pBR658-6 ein 4,9 Kb großes Fragment, von dem bekannt ist, daß es zu 3,24 Kb aus Vektor-DNS und zu 1,66 Kb aus der 3'-terminalen Randregion des klonierten DNS-Stückchens besteht. Diese Region scheint also homologe Basensequenzen zu enthalten, die auch im P12 bzw. P4-Fragment der sfa-Determinante zu finden sind. In der Pst I-geschnittenen DNS des Wildtyps zeigen sich statt der P12- und P4-Fragmente zwei Fragmente (Banden) mit einer Größe von etwa 4,5 und 6,4 Kb. D.h., daß die nächste Pst I-Schnittstelle im Chromosom des Wildtyps außerhalb des klonierten, Sau 3A-geschnittenen 658-6-Fragments liegt, und zwar entweder 4,5 oder 6,4 Kb oberhalb des P11-Fragments.

3.4. Darstellung der am Fimbrienaufbau beteiligten Genprodukte

Bei bisher beschriebenen Fimbrientypen sind an der Ex-

pression der Fimbrien mehrere Proteine beteiligt. Dazu gehören neben Proteinen, denen Transportfunktionen zugeschrieben werden, auch solche, die am Aufbau der Fimbrien aus ihren Untereinheiten mitwirken (17, 101, 140). Um die Proteine zu charakterisieren, die an der Biogenese der klonierten Fimbrien beteiligt sind, wurde das rekombinante Plasmid pBR658-6 in *E. coli* DS 410 übertragen. Dieser Stamm produziert während der logarithmischen Wachstumsphase durch atypische Zellteilungen sogenannte Minizellen, die keine chromosomale DNS aber Proteine und Ribonucleinsäuren enthalten. Während des Teilungsprozesses können jedoch auch Plasmide in die Minizellen gelangen. Durch Anzucht dieser Minizellen in Gegenwart radioaktiver Aminosäuren können anschließend selektiv neusynthetisierte, also plasmidkodierte Proteine, markiert werden. Um die markierten Proteine darzustellen, werden anschließend die Minizellen lysiert, das Totallysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel mit einem Röntgenfilm kontaktiert. Dabei wird der Film an den Stellen geschwärzt, an denen sich radioaktive Proteinbanden im Gel befinden.

Mit Hilfe dieser Technik konnte gezeigt werden, daß Minizellen von *E. coli* DS 410/658-6, die in Gegenwart eines ^{14}C -Aminosäuregemisches angezüchtet wurden, neben der Vektor-kodierten β -Lactamase mindestens sechs verschiedene Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 87, 31, 23, 17,

14,3 und 13,8 Kilodalton synthetisieren (Abb.16). Dabei repräsentiert die 17 K Bande wahrscheinlich die Fimbrienuntereinheit, da die klonierten Fimbrien aus 17 k Polypeptiden bestehen.

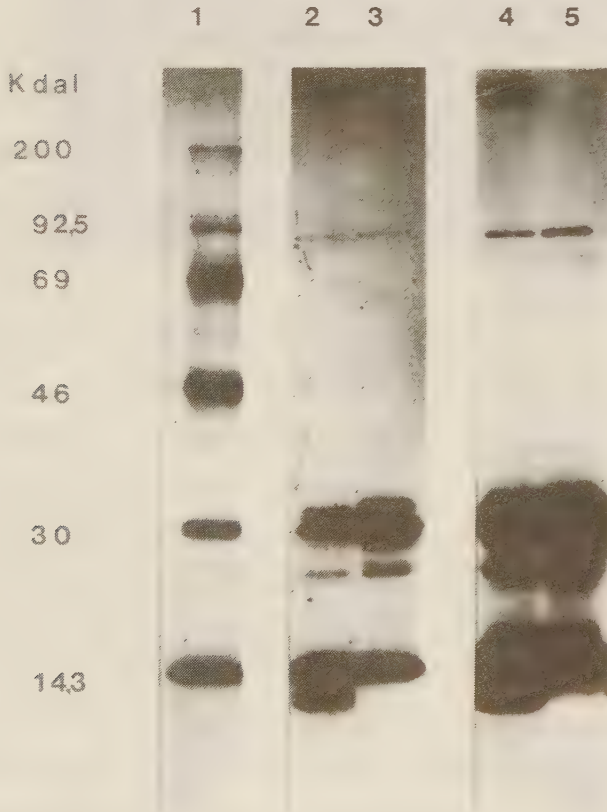


Abb. 16: Autoradiographie der pBR658-6 kodierten Proteine. Die Proteine in den Banden 2 und 4 sind mit einem ^{14}C -Aminosäuremix markiert, in den Banden 3 und 5 mit ^{35}S -Methionin. In den Banden 2 und 3 wurde die Autoradiographie nach 24 Stunden gestoppt, in den Banden 4 und 5 nach 72 Stunden. In Bande 1 sind Standardproteine dargestellt.

Durch Anzucht der Minizellen in Gegenwart von ^{35}S -Methionin lassen sich dieselben Proteine darstellen, mit Ausnahme der 13,8 K Bande, was darauf hindeutet, daß dieses Protein kein Methionin enthält.

3.5. Phasenvariation der klonierten Fimbrien

Für Typ I und S-Fimbrien konnte gezeigt werden, daß diese Fimbrien einer Phasenvariation unterliegen (33, 69, 103). Darunter versteht man, daß innerhalb einer Bakterienpopulation Formen vorliegen, die diese Fimbrien exprimieren als auch Keime, bei denen Fimbrien nicht nachweisbar sind. Erste Hinweise, daß dieses Phänomen auch für die klonierten Fimbrien zutrifft, lieferten elektronenoptische Untersuchungen der Transformante HB 101/658-6. Dabei zeigte sich, daß innerhalb einer Übernachtskultur nur ein Teil der Bakterien diese Fimbrien exprimiert, während bei dem Rest der Kultur diese Strukturen nicht nachweisbar waren. Die fehlende Fimbrienexpression der Transformante könnte jedoch auch auf einen Verlust des Plasmids zurückzuführen sein. Um zu überprüfen, ob die klonierten Fimbrien konstitutiv gebildet werden oder nicht, wurden die weiteren Untersuchungen daher mit dem Wildtyp BK 658 durchgeführt. Dazu wurde eine Übernachtskultur des Stammes mit Antiserum, das gegen die klonierten Fimbrien gerichtet war, inkubiert. Die Bindung der Antikörper an die untersuchten Fimbrien wurde mit einem fluoreszierenden Zweitantikörper in der indirekten Immunfluoreszenz nachgewiesen (Abb. 17).



Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz von Bakterien des Stammes BK 658 nach Inkubation mit Antiserum gegen die klonierten Fimbrien und einem FITC-markierten 2. Antikörper (Vergr. 1500x).

Abb. 16 macht deutlich, daß nur wenige Bakterien des Stammes BK 658 die untersuchten Fimbrien exprimieren. Das bedeutet, daß die klonierten Fimbrien, wie Typ I und S-Fimbrien, ebenfalls einer Phasenvariation unterliegen.

3.6. Untersuchungen zur biologischen Funktion der klonierten Fimbrien

Für die meisten Fimbrien ist beschrieben, daß sie als Träger von Adhäsinen die Bindung der Bakterien an Zellen des Wirtes ermöglichen (32, 42, 58). Um zu überprüfen, ob eine derartige Funktion auch für die klonierten Fimbrien nach-

weisbar ist, wurde die Transformante HB 101/658-6 mit verschiedenen Zelltypen inkubiert. Als Kontrolle wurde jeweils der Stamm HB 101 und der Wildtyp BK 658 mitgetestet. Es zeigte sich jedoch, daß die Transformante - im Gegensatz zu dem Blutkultur-Isolat - an keine der untersuchten Zellen adhärierte (Tab. 7).

Tab. 7: Adhärenz der Bakterien an verschiedene Zelltypen

Stamm	Adhärenz an			
	Maus-MØ der Linie P 388D1	Humane PMN's	HeLa-Zellen	Nierengewebe
BK 658	+	+	+	+
HB 101	-	-	-	-
HB 101/658-6	-	-	-	-

+ entspricht über 10 Keime/Zelle, bzw. eine starke Bindung an die Nierengewebsschnitte, - entspricht einer Bindung von weniger als einem Keim/Zelle, bzw. keiner Bindung an Nierengewebe.

3.7. Vorkommen der klonierten Fimbrien auf weiteren E. coli Blutkultur-Isolaten

Die Expression der klonierten Fimbrien auf den anderen Blutkultur-Isolaten, die für diese Arbeit ausgewählt wurden, wurde zum einen genetisch und zum anderen immunologisch überprüft. Dazu wurden folgende Methoden verwendet:

1. DNS-Filterhybridisierung
2. ELISA

3.7.1. DNS-Filterhybridisierung

Um zu überprüfen, ob die anderen, für diese Arbeit ausgewählten Blutkultur-Isolate, ebenfalls das untersuchte Fimbriengen enthalten, d.h. über Sequenzen in ihrer DNS verfügen, die diesem Gen homolog sind, wurden Filterhybridisierungsexperimente mit der DNS der Blutkultur-Isolate und einer Biotin-markierten Fimbriengenprobe durchgeführt. Dazu wurde die gereinigte DNS der Blutkultur-Isolate mit Pst I geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und anschließend mit der markierten Genprobe hybridisiert. Pst I wurde gewählt, da sich mit diesem Enzym ein ganz charakteristisches Spaltmuster der klonierten Fimbriengensequenz zeigt. Als Sonden-DNS wurde für die Hybridisierung ein Hind III/Sal I-Fragment von pBR658-6 verwendet. Dieses Fragment besteht fast ausschließlich aus der klonierten, chromosomalen DNS (12,9 Kb) und nur zu einem geringen Teil aus Vektor-DNS (0,62 Kb). Als Kontrolle für die Hybridisierung wurde sowohl Pst I-geschnittenes pBR658-6 als auch das Pst I-geschnittene Hind III/Sal I-Fragment von pBR658-6 mitgetestet.

Das Ergebnis der Filterhybridisierung ist in Abbildung 18 dargestellt. Aufgrund der Selbsthybridisierung zeigen sowohl die Hind III/Sal I-Probe, die pBR658-6-Fragmente als auch die DNS des Wildtyps BK 658 eine deutliche Reaktion. Dabei ist der Effekt mit der DNS des Wildtyps schwächer ausgeprägt, da die aufgetrennte, chromosomale DNS anteil-

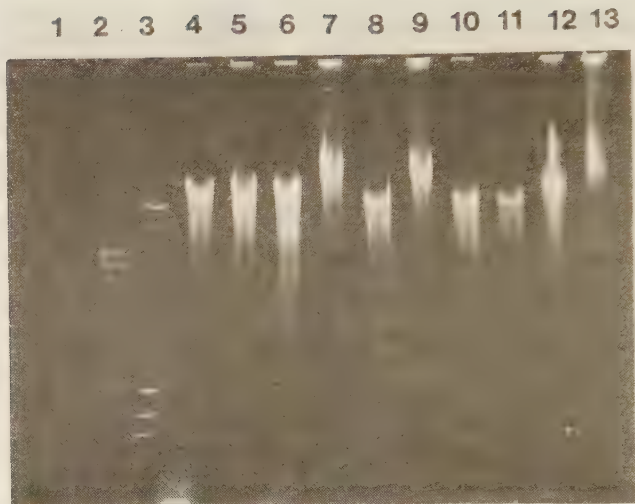


Abb. 18a: Pst I-Spaltmuster des Hind III/Sal I-Fragments von pBR658-6 (1), von pBR658-6 (2) sowie der DNS der Stämme BK 658 (4), BK 595 (5), BK 797 (6), BK 1001 (7), BK 1034 (8), BK 1361 (9), BK 1369 (10), BK 944 (11), BK 740 (12), BK 1454 (13) im 0,7% Agarose-Gel. In Bande 3 sind Standardfragmente dargestellt (s. Abb. 13).

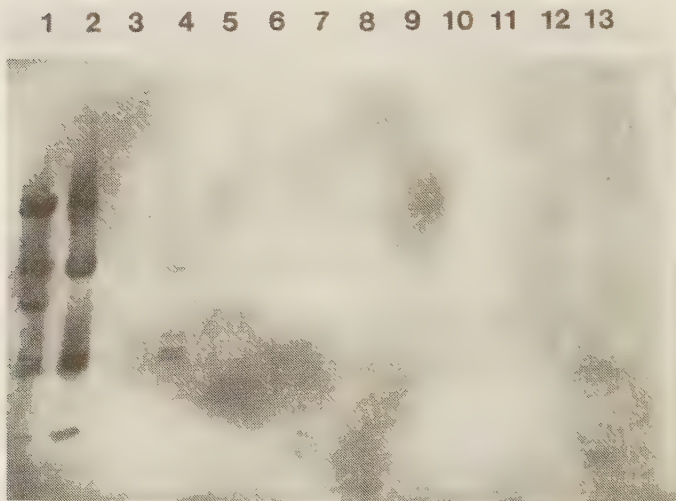


Abb. 18b: Filterhybridisierung. Die DNS-Fragmente aus dem Gel in Abb. 18a wurden geblottet und mit dem Biotin-markierten Hind III/Sal I-Fragment hybridisiert.

3.7.2. ELISA der Blutkultur-Isolate mit Antiserum gegen die klonierten Fimbrien

Eine weitere Möglichkeit, die Expression der untersuchten Fimbrien auf *E. coli* Blutkultur-Isolaten zu überprüfen, bietet der Ganzzell-ELISA mit intakten Bakterien und Antiserum, das gegen die klonierten Fimbrien gerichtet ist. Mit Hilfe dieses Tests konnten diese Fimbrien sowohl auf den Kontrollstämmen HB 101/658-6 und BK 658 als auch auf dem Stamm BK 944 nachgewiesen werden (Abb. 19).

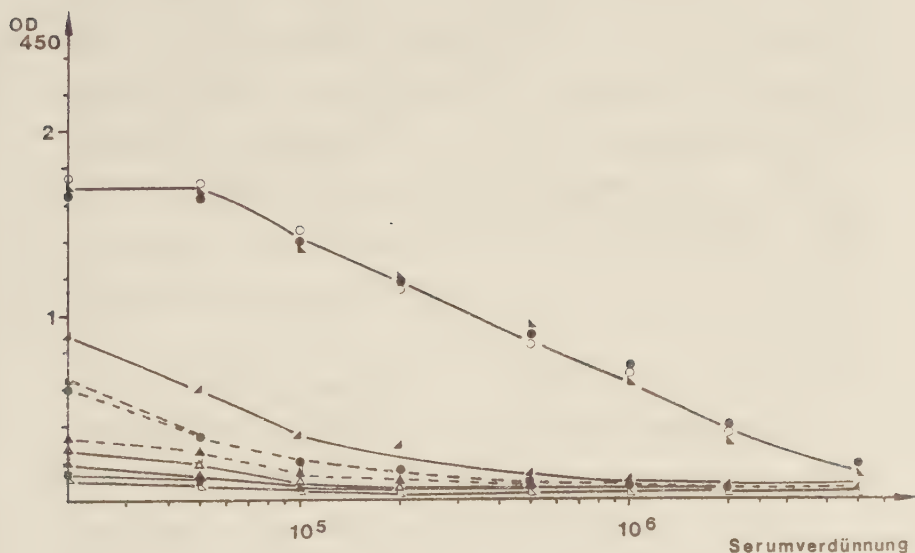


Abb. 19: Ganzzell-ELISA mit Antiserum gegen die klonierten Fimbrien und Bakterien der Stammes HB 101/658-6 (●—●), BK 658 (○—○), BK 595 (◻—◻), BK 797 (△—△), BK 1001 (▲—▲), BK 1034 (▲---▲), BK 1361 (●---●), BK 1369 (■—■), BK 740 (▲---▲), BK 944 (◻—◻), BK 1454 (◻---◻) und HB 101 (◻—◻).

Mit diesem Testergebnis wird gleichzeitig die Spezifität des Antiserums für die klonierten Fimbrien deutlich. Das Antiserum reagierte nur mit solchen Stämmen, die auch in der spezifischen DNS-Hybridisierung positiv waren. Für das Screening weiterer E. coli Stämme auf die Expression des klonierten Fimbrientyps wurde daher nur noch der Ganzzell-ELISA eingesetzt.

3.8. Häufigkeit des klonierten Fimbrientyps bei E. coli

Um festzustellen, wie häufig der untersuchte Fimbrientyp bei E. coli vorkommt, wurden 46 weitere Blutkultur-Isolate, 20 E. coli Stämme aus Harnwegsinfekten und 20 E. coli Stämme aus Stuhlproben hinsichtlich ihrer Reaktion mit dem Antiserum gegen die klonierten Fimbrien im Ganzzell-ELISA getestet. Es konnte jedoch in keinem Fall eine Expression dieses Fimbrientyps nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Lokalisation der Fimbriengendeterminanten bei Blut- kultur-Isolaten

Fimbrien stellen für *Escherichia coli* einen wichtigen Pathogenitätsfaktor dar. Eine Vielzahl von Studien machte deutlich, daß diese Strukturen durch eine spezifische Bindung an Zielzellen des Wirtes die Entstehung von Infektionen begünstigen oder sogar erst ermöglichen (55, 56, 131, 138). Dabei zeigte sich, daß Mannose resistente Fimbrien meist mit ganz charakteristischen Krankheitsbildern assoziiert sind, während Mannose sensible Fimbrien, unabhängig von der Art der Infektion, auf fast allen *E. coli* Stämmen zu finden sind (63, 69). Die Tatsache, daß dadurch häufig verschiedene Fimbrientypen gleichzeitig von ein und demselben Stamm exprimiert werden, erschwert die Analyse und Charakterisierung eines einzelnen Fimbrientyps.

Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden erlaubt es jedoch, durch die Übertragung von genetischem Material einzelne Fimbrientypen in einen definierten Laborstamm zu klonieren und zur Expression zu bringen. Dadurch ist es nicht nur möglich, gezielt die biochemischen, morphologischen und funktionellen Eigenschaften eines bestimmten Fimbrientyps zu analysieren, vielmehr können auch durch Untersuchungen der klonierten Gensequenz Aussagen über die genetische Organisation des entsprechenden Fimbrientyps

getroffen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fimbrien ausgewählter Sepsis-induzierender *E. coli* Stämme molekularbiologisch untersucht. Im Gegensatz zu enterohämorrhagischen *E. coli*, deren Fimbrien von einem gemeinsamen, 60 Megadalton großen Plasmid kodiert werden (61), konnte bei den untersuchten Sepsis-induzierenden *E. coli* Stämmen kein charakteristisches, für die Fimbriensynthese kodierendes Plasmid identifiziert werden. Von zehn getesteten Stämmen wiesen nur sechs Stämme Plasmide auf. Darüber hinaus konnte bei den plasmidhaltigen Keimen in keinem Fall nachgewiesen werden, daß die extrachromosomale DNS für die Expression der Fimbrien verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit den in der Literatur erhobenen Befunden, daß die Fimbrien extraintestinaler *E. coli* Isolate chromosomalen Ursprungs sind (38, 50, 51). Plasmidkodierte Fimbrientypen sind offensichtlich nur mit darmpathogenen Keimen assoziiert. Aus diesem Grund war es notwendig, die Fimbrien der Sepsis-Isolate auf chromosomaler Ebene zu untersuchen.

4.2. Klonierung und Charakterisierung von Fimbrien des *E. coli* Stammes BK 658

Der *E. coli* Stamm BK 658 exprimiert neben Typ 1A und Typ 1B Fimbrien noch einen dritten Fimbrientyp, der mit anti-

S-Fimbrien-Antiserum kreuzreagiert. Der Wildtyp zeigt jedoch nicht die für S-Fimbrien typische Agglutination von Rindererythrozyten. Durch die Klonierung chromosomaler DNS-Fragmente des Blutkultur-Isolates in *E. coli* HB 101 konnte dieser Fimbrientyp selektiv in dem Laborstamm etabliert und zur Expression gebracht werden. Dadurch konnte gezeigt werden, daß es sich bei diesen Fimbrien um Strukturen mit einer Länge von 1,2 μ m und einem Durchmesser von etwa 7 nm handelt. Das entspricht etwa der Größe, die auch für Typ 1, P- und S-Fimbrien bestimmt wurde (14, 66). Gleichzeitig lassen sich die klonierten Fimbrien damit morphologisch deutlich von den wesentlich dünneren K99, K88, F41, und CS3-Fimbrien darmpathogener *E. coli* abgrenzen (18, 19, 77, 129).

Funktionell konnten die klonierten Fimbrien keinem bekannten Typ zugeordnet werden. Weder die Transformante noch die gereinigten Fimbrien sind in der Lage, Erythrozyten verschiedener Tierspezies zu agglutinieren. Fehlende Hämagglutinationseigenschaften sind bisher nur bei Typ 1B, Typ 1C und 987P-Fimbrien beschrieben (63, 123, 136). 987P-Fimbrien haben jedoch ein Molekulargewicht von 23 K pro Untereinheit und werden nur von *E. coli* Stämmen exprimiert, die Durchfallserkrankungen in Ferkeln induzieren (s. Tab. 1). Eine Identität oder Teilidentität der klonierten Fimbrien mit 987P-Fimbrien ist damit sicherlich auszuschließen. Eine Verwandtschaft mit 1B oder 1C Fimbri-

en ist aufgrund serologischer Testergebnisse ebenfalls auszuschließen (F. und I. Ørskov, persönliche Mitteilung).

Im Western-Blot zeigten die klonierten Fimbrien eine Reaktion mit Antiserum, das gegen S-Fimbrien gerichtet ist. Umgekehrt reagierten S-Fimbrien im Immunoblot nicht mit Antiserum gegen HB 101/658-6-Fimbrien. Diese Ergebnisse zeigten sich nicht nur mit denaturierten Fimbrienuntereinheiten im Immunoblot, sondern auch mit nativen Fimbrien in einem ELISA. Diese Befunde lassen sich dahingehend interpretieren, daß beide Fimbrientypen zu einem gewissen Teil über Aminosäuresequenzhomologien verfügen müssen. Diese Bereiche werden offensichtlich nur von den S-Fimbrien in immunogener Form präsentiert, sodaß Antikörper gegen diese Determinanten nur bei einer Immunisierung mit S-Fimbrien, nicht aber mit HB 101/658-6-Fimbrien erzielt werden. Darüber hinaus verfügen beide Fimbrientypen auch über typspezifische antigene Determinanten.

Im Zusammenhang mit den morphologischen und funktionellen Eigenschaften der klonierten Fimbrien deuten die serologischen Befunde darauf hin, daß es sich bei den Fimbrien der Transformante und den untersuchten S-Fimbrien um unterschiedliche Subtypen handeln könnte.

Subtypen von Fimbrien sind vielfach beschrieben. Dabei basiert die Unterteilung von Fimbrien in einzelne Subtypen

auf Unterschieden in den serologischen Eigenschaften und/oder den Bindungseigenschaften. Bei Typ 1 Fimbrien unterscheiden sich die Subtypen 1A, 1B und 1C zum einen hinsichtlich ihrer anigenen Determinanten (63), zum zweiten aber auch zusätzlich hinsichtlich ihrer Bindungseigenschaften, wobei nur 1A in der Lage ist, an alpha-D-Mannosehaltige Rezeptorstrukturen zu binden, während bei 1B und 1C keine adhäsiven Eigenschaften bekannt sind. Antigene Variationen sind auch bei den K88-Fimbrien (ab, ac, ad) beschrieben (32). Die einzelnen Subtypen zeigen jedoch alle das gleiche Adhärenzverhalten an Digalactosid-haltige Rezeptorstrukturen auf Dünndarmepithelzellen. Ähnliche Ergebnisse liegen auch für P-Fimbrien vor. Obwohl für diesen Fimbrientyp insgesamt acht verschiedene antigene Variationen beschrieben sind, zeigen alle Subtypen die gleiche Rezeptorspezifität. Dies spiegelt sich zum einen in der Fähigkeit wider, menschliche Erythrozyten mit dem P-Blutgruppenantigen zu agglutinieren, aber auch in der Eigenschaft, spezifisch an Digalactosid-haltige Rezeptoren auf Nierenepithelzellen zu binden (71, 76). Demgegenüber sind bei S-Fimbrien bisher keine Subtypen bekannt. Alle bekannten S-Fimbrien ähneln sich stark hinsichtlich ihrer serologischen Eigenschaften sowie ihrer Rezeptorspezifität. Sämtliche beschriebenen S-Fimbrien binden an Sialinsäur-haltige Rezeptorstrukturen auf Rindererythrozyten und auf Zielzellen in der Niere, im Gehirn und in anderen Organen.

Hinweise, daß die Fimbrien der Transformante HB 101/658-6

und die untersuchten S-Fimbrien eng miteinander verwandt sind, aber unterschiedliche Subtypen repräsentieren, konnten auch auf genetischer Ebene erzielt werden. Die Determinanten beider Fimbrientypen enthalten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme Pst I, Eco RI, Eco RV, Sph I und Cla I. Dabei sind die Schnittstellen für die vier letztgenannten Enzyme in beiden Determinanten an etwa gleicher Stelle lokalisiert oder nur geringfügig verschoben. Unterschiede zeigen sich jedoch bei den Pst I-Schnittstellen und den daraus resultierenden Fragmenten.

Die sfa-Determinante wird durch das Restriktionsenzym Pst I in sechs verschiedene Fragmente geschnitten, die mit P5, P9, P8, P11, P12 und P4 gekennzeichnet worden sind (38). Darüber hinaus befindet sich ein weiteres Fragment, P10, außerhalb der Fimbrienstrukturgene in der 5'-terminalen Randregion. Vier dieser Fragmente, P5, P9, P8 und P11, lassen sich auch in der 658-6 Determinante nachweisen. Dabei haben diese Fragmente in beiden Fimbriendeterminanten nicht nur die gleiche Größe und die gleiche Lage zueinander, vielmehr lassen sich aufgrund von Hybridisierungsexperimenten auch große Sequenzhomologien annehmen.

Im Gegensatz dazu fehlt das P10-Fragment in der 658-6-Sequenz völlig. Statt der Fragmente P12 und P4 enthält die Determinante des Blutkultur-Isolates ein Pst I-Fragment von etwa 4,5 bzw. 6,4 Kb. Eines der beiden durch Hybrid-

sierungsexperimente dargestellten Fragmente ist vermutlich auf Kreuzhybridisierungen der sfa-Genprobe mit Genabschnitten von Typ 1 Fimbrien zurückzuführen (113). Das andere Fragment muß - wie auch die Hybridisierung der sfa-Probe mit Pst I-geschnittener pBR658-6-DNS zeigt - homologe DNS-Sequenzen enthalten, die auch in den Fragmenten P12/P4 der sfa-Determinante zu finden sind. Transposoninsertionsmutagenesen in der sfa-Determinante ergaben, daß gerade dieser Bereich für die Fimbrienuntereinheit kodiert (38). Das unterschiedliche serologische Verhalten beider Fimbrientypen läßt sich daher sicherlich auf Variationen in der P12/P4-Region zurückführen.

Diese Variationen erklären jedoch nicht das unterschiedliche Adhärenzverhalten der beiden Fimbrien. Bei den S-Fimbrien werden das Adhäsion und die Fimbrien selbst funktionell unabhängig voneinander exprimiert. Dabei wird das Adhäsion von einer Genregion kodiert, die in den Fragmenten P5/P9 lokalisiert ist (38, 94). An Hand der Restriktionskarten lassen diese Fragmente jedoch keinen Unterschied in den beiden Fimbriendeterminanten erkennen. Daß die Fragmente in beiden Determinanten über homologe DNS-Sequenzen verfügen, konnte durch die Hybridisierungsexperimente gezeigt werden. Warum diese Region dennoch weder in der Transformante noch im Wildtyp BK 658 für ein funktionell nachweisbares S-Agglutinin kodiert, konnte nicht geklärt werden.

Insgesamt können die Ergebnisse der Restriktionsanalysen und der Hybridisierungsexperimente dahingehend interpretiert werden, daß beide Fimbriendeterminanten sowohl über gemeinsame konstante als auch über variable Regionen verfügen. Dabei liegen die konstanten Regionen in dem Bereich, der in der sfa-Determinante für die Biosynthese und Adhärenzeigenschaften kodiert, während die variablen Regionen insbesondere in dem Teil lokalisiert sind, der für die Fimbrienuntereinheit kodiert.

Ähnliche Befunde konnten auch bei P-Fimbrien erhoben werden. Die Restriktionskarten aller P-Fimbriendeterminanten enthalten neben einem großen Ausmaß an konstanten Regionen auch variable Regionen, die für jeden P-Fimbriensubtyp verschieden sind (142, 143). Dabei liegen die konstanten Regionen - ähnlich wie bei den untersuchten S-Fimbrien - hauptsächlich in den DNS-Abschnitten, die für das Adhäsion kodieren und für Proteine, die an der Biogenese der P-Fimbrien beteiligt sind. Es wird angenommen, daß sich die serologisch unterschiedlichen Fimbriensubtypen unter dem Druck der Infektabwehr des Wirtes aus einem gemeinsamen Ausgangsgen entwickelt haben. In Anlehnung daran könnte man vermuten, daß auch den klonierten Fimbrien des Blutkultur-Isolates und den S-Fimbrien ein gemeinsames "Urgen" zugrunde liegt. Beide Fimbriendeterminanten wären damit als unterschiedliche Subtypen dieser Gensequenz zu verstehen.

4.3. Darstellung der pBR658-6- Genprodukte

Das rekombinante Plasmid pBR658-6 kodiert nicht nur für die 17 K Fimbrienuntereinheit, sondern darüber hinaus noch für eine Reihe weiterer Proteine mit einem Molekulargewicht von 87 K, 31 K, 23 K, 14,3 K und 13,8 K. Ähnliche Proteine werden auch von den genetischen Determinanten anderer Fimbrientypen kodiert. Dabei handelt es sich bei den niedermolekularen Proteinen um Moleküle, die an der Biogenese der Fimbrien beteiligt sind bzw. für die adhäsiven Eigenschaften der Fimbrien verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu stellen die hochmolekularen Proteine (83 K - 90 K) Basal- oder Ankerproteine der Fimbrien in der äußeren Membran der Bakterien dar (80, 97, 105). Es ist daher wahrscheinlich, daß das 87 K Protein der 658-6-Determinante ebenfalls eine Ankerfunktion ausübt.

Die Größe der genetischen Determinanten anderer chromosomal kodierter Fimbrien liegt zwischen etwa 5 und 9 Kb (20, 21, 38, 102, 141). Es ist daher wahrscheinlich, daß auch die Genregion, die für die klonierten Fimbrien des Stammes HB 101/658-6 kodiert, kleiner ist als das 12,9 Kb DNS-Fragment aus pBR658-6. Daher ist nicht auszuschließen, daß nicht alle der von dem klonierten Chromosomenstückchen kodierten Proteine an der Biosynthese der Fimbrien beteiligt sind. Die Subklonierung kleinerer Fragmente und Transposoninsertionsmutagenesen wären erforderlich, um zu klären, welche der Proteine für die Synthese der Fimbrien be-

nötigt werden, und welche Funktionen diese Proteine dabei ausüben.

4.4. Expression und pathogene Bedeutung der klonierten ----- Fimbrien -----

Untersuchungen zur Expression der klonierten Fimbrien führten zu dem Ergebnis, daß diese Strukturen nur von einem Teil der Bakterienpopulation gebildet werden. Das konnte nicht nur für die Transformante HB 101/658-6, sondern auch für den Wildtyp BK 658 gezeigt werden. Dieses Phänomen ist auch bei Typ 1, P- und S-Fimbrien bekannt und ist unter dem Begriff "Phasenvariation" beschrieben (53, 103, 117).

Es ist heute allgemein akzeptiert, daß die Phasenvariation der Fimbrien einen bedeutenden Pathogenitätsmechanismus darstellt. Die Fähigkeit der Bakterien, von einem fimbrierten in einen nicht-fimbrierten Zustand und umgekehrt zu wechseln, bietet den Keimen in vielerlei Hinsicht Vorteile. Einerseits hilft die Variation von Oberflächenantigenen den Bakterien, sich vor der spezifischen Infektabwehr des Wirtes zu schützen. So konnte gezeigt werden, daß während einer akuten Pyelonephritis Antikörper gegen P-Fimbrien gebildet werden (130). Aufgrund der Phasenvariation bleibt jedoch ein Teil der Bakterien, die den Harnwegstrakt besiedeln, von den Antikörpern unbeeinflusst. Zum zweiten bewirkt die Phasenvariation, daß unter Bedingungen, unter denen eine Fimbriensynthese nicht erforderlich ist, der Keim

seine Stoffwechselenergie ausschließlich zur Zellproliferation verwenden kann. Drittens ist bekannt, daß die unterschiedlichen Adhäsine uropathogener *E. coli* an unterschiedliche Bereiche im Harnwegstrakt binden. In vivo verhilft die Phasenvariation den Bakterien wahrscheinlich dazu, sich schnell an unterschiedliche Gewebe und damit auch an unterschiedliche Rezeptoren anzupassen.

Während die Rezeptoren oder zumindest Zielzellen für die meisten Fimbrientypen bekannt sind, konnte für die klonierten Fimbrien der Transformante bisher kein Zelltyp identifiziert werden, an den diese Strukturen binden. Dabei wurden sowohl Zellen des phagozytären Systems als auch Epithelzellen und Nierengewebsschnitte untersucht.

Das fehlende Bindungsvermögen an Phagozyten ist - von wenigen Ausnahmen abgesehen - charakteristisch für nicht Mannose sensible Fimbrien (46). In vivo verhilft diese Eigenschaft den Bakterien, sich vor der unspezifischen zellulären Infektabwehr zu schützen und steigert dadurch die Pathogenität der Keime. Unklar ist jedoch, warum die klonierten Fimbrien nicht an Epithelzellen bzw. Nierengewebsschnitte binden. Insbesondere im Hinblick darauf, daß der Wildtyp BK 658 von einem Patienten mit Urosepsis isoliert wurde, d.h. daß dieser Keim die Blutbahn über die Niere erreicht hat.

Für S-Fimbrien ist beschrieben, daß diese Strukturen die Bindung an Sialinsäure-haltige Rezeptorstrukturen auf Epithel- und vasculären Endothelzellen der Niere vermitteln. Die fehlende Adhärenz der klonierten Fimbrien an Nierengewebsschnitte könnte durch eine unterschiedliche Rezeptordichte auf den Nieren verschiedener Individuen erklärt werden. Eine ungleiche, individuenspezifische Rezeptordichte konnte z.B. für P-Fimbrien nachgewiesen werden. Untersuchungen an den Nieren zweier Mäuseinzuchtstämme, CBA und Balb/c, zeigten, daß der Gehalt an Glycolipiden, die von P-Fimbrien erkannt und gebunden werden, in CBA-Mäusen deutlich höher ist als in Balb/c-Mäusen (4). Als Konsequenz ergibt sich daraus, daß die Nieren von CBA-Mäusen von P-Fimbrien-tragenden *E. coli* wesentlich effizienter besiedelt werden als die Nieren der Balb/c-Mäuse (43, 44). Eine unterschiedliche Rezeptordichte, verknüpft mit einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber Infektionen mit P-fimbrierten *E. coli*, wurde auch bei Menschen beobachtet (81, 82). Adhärenztests mit ganzen Bakterien zeigten, daß die Keime an Epithelzellen aus dem Urin von Patienten mit rekurrierenden Harnwegsinfekten viel effizienter banden als an Epithelzellen aus dem Urin gesunder Personen (57).

Die unterschiedliche Expression von Rezeptorstrukturen scheint auch bei der Entstehung von Infektionen durch S-Fimbrien-tragende *E. coli* Keime von Bedeutung zu sein.

Untersuchungen mit S-fimbrierten Coli-Stämmen im Ratten-infektionsmodell zeigten, daß diese Keime nur an die Nieren eines bestimmten Inzuchtstammes binden, nicht aber an die Nieren anderer Rattenstämme (Marre, persönliche Mitteilung). Die geringe Häufigkeit der klonierten S-ähnlichen Fimbrien der Transformante HB 101/658-6 legt die Vermutung nahe, daß es sich hierbei um einen ähnlichen Mechanismus handelt. Wahrscheinlich binden diese Fimbrien an Rezeptorstrukturen, die nur von wenigen Individuen (in ausreichender Form) exprimiert werden. Weitere Untersuchungen - vielleicht an Biopsiematerial infizierter Patienten - wären notwendig, um die Rezeptorstruktur für die klonierten S-ähnlichen Fimbrien zu identifizieren, und um die pathogene Bedeutung dieses neuen Fimbrientyps zu klären.

5. Zusammenfassung

Fimbrien stellen einen bedeutenden Virulenzfaktor von *E. coli* dar. Durch ihre Interaktion mit Zielzellen des Wirtes tragen diese Strukturen wesentlich zur Entstehung von Infektionen bei. Während die Fimbrien darmpathogener und uropathogener *E. coli* molekularbiologisch hinreichend untersucht sind, sind derartige Studien an Sepsis-induzierenden Stämmen bisher kaum durchgeführt. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit an zehn *E. coli* Stämmen, die aus Sepsispatienten isoliert worden waren, genetische Untersuchungen zur Fimbrienexpression durchgeführt. Dabei konnte zunächst gezeigt werden, daß für die Fimbrienexpression kein gemeinsames, charakteristisches Plasmid verantwortlich ist. Von den zehn Stämmen enthielten nur sechs Stämme Plasmide. Bei den plasmidhaltigen Stämmen konnte in keinem Fall nachgewiesen werden, daß die extrachromosomale DNS für die Fimbriensynthese verantwortlich ist. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Fimbrienexpression daher auf chromosomaler Ebene untersucht. Dafür wurde der Stamm BK 658 ausgewählt, der neben Typ 1A und Typ 1B Fimbrien noch einen dritten, bisher unbekannten Fimbrientyp exprimiert. Dieser Fimbrientyp reagiert mit anti-S-Fimbrienantiserum, zeigt jedoch nicht die für S-Fimbrien charakteristische Agglutination von Rindererythrozyten. Durch die Übertragung der entsprechenden genetischen Determinante in den Laborstamm HB 101 konnte dieser Fimbrientyp biochemisch, serologisch und genetisch analysiert werden. Dabei konnte zunächst ge-

zeigt werden, daß dieser Fimbrientyp aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 17 K aufgebaut ist. An der Expression der Fimbrien sind vermutlich noch fünf weitere Proteine mit einem Molekulargewicht von 27 K, 31 K, 23 K, 14,3 K und 13,8 K beteiligt. Serologisch lassen sich verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den klonierten Fimbrien und S-Fimbrien nachweisen. Diese verwandtschaftlichen Beziehungen zeigen sich auch auf genetischer Ebene. Die genetischen Determinanten beider Fimbrientypen zeigen für einige Restriktionsenzyme nahezu identische Spaltmuster. Darüber hinaus kann aufgrund von Hybridisierungsexperimenten auch ein hohes Maß an Sequenzhomologien angenommen werden. Insgesamt konnte durch die genetischen Analysen gezeigt werden, daß beide Fimbriendeterminanten über konstante, aber auch über variable Regionen verfügen. Dabei liegen die variablen Regionen insbesondere in dem Bereich, der für die Fimbrienuntereinheit kodiert.

Ähnlich wie S-Fimbrien werden auch die klonierten Fimbrien nicht konstitutiv von allen Bakterien einer Population gebildet, sondern unterliegen einer Phasenvariation. Adhärenztests mit verschiedenen eukaryontischen Zellen ließen bisher nicht erkennen, an welche Zielzellen die klonierten Fimbrien binden. Untersuchungen zur Häufigkeit der klonierten Fimbrien auf weiteren *E. coli* Stämmen aus Blutkulturen (n= 55), Harnwegsinfekten (n=20) und Stuhlproben (n=20) ergaben bei einem Blutkultur-Isolat ein positives Ergebnis.

Insgesamt lassen sich die vorliegenden Daten dahingehend zusammenfassen, daß es sich bei den klonierten Fimbrien um einen seltenen, bisher unbekannten S-Fimbriensubtyp handelt. Dieser Subtyp unterscheidet sich von den bereits beschriebenen S-Fimbrien serologisch, insbesondere aber durch eine andere, bisher nicht bekannte Rezeptorspezifität. Dies legt eine unterschiedliche biologische Funktion beider Fimbrientypen nahe.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements, and B. I. Eisenstein (1985). An invertible element for DNA controls phase variation of Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5724-5727
2. Abraham, S. N., J. P. Babu, C. S. Giampapa, D. L. Hasty W. A. Simpson, and E. H. Beachey (1985). Protection against *Escherichia coli*-induced urinary tract infections with hybridoma antibodies directed against type 1 fimbriae or complementary D-mannose receptors. *Infect. Immun.* 48: 625-628
3. Abraham, S. N., E. H. Beachey (1987). Assembly of a chemically synthesized peptide of *Escherichia coli* type 1 fimbriae-like antigenic structures. *J. Bacteriol.* 169: 2460-2465
4. Adams, E. P., and G. M. Gray (1968). The carbohydrate structures of the neutral ceramide glycolipids in kidneys of different mouse strains with special reference to the ceramide dihexosides. *Chem. Phys. Lipids* 2: 147-155
5. Aronson, M., D. Medalia, L. Schori, D. Mirelman, N. Sharon, I. Ofek (1979). Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl- α -mannopyranoside.

6. Babu, J., S. Abraham, M. Babbou, E. Beachey (1986). Interaction of a 60-kilodalton D-mannose-containing salivary glycoprotein with type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 54: 104-108
7. Båga, M., M. Göransson, S. Normark, and B. E. Uhlin (1985). Transcriptional activation of a *pap pilus* virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J.* 4: 3887-3893
8. Båga, M., M. Norgren, and S. Normark (1987). Biogenesis of *E. coli pap pili*: *papH*, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* 49: 241-251
9. Beachey, E. H. (1981). Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143: 325-345
10. Binns, M. M., D. L. Davis, and K. G. Hardey (1979). Cloned fragments of the plasmid Col V,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279: 778-781
11. Birnboim, H. C., and J. Doly (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1522

12. Bortolussi, R., P. Ferrieri, B. Björkstén, P. Quie (1979). Capsular K1 polysaccharide of *Escherichia coli*: relationship to virulence in newborn rats and resistance to phagocytosis.
Infect. Immun. 25: 293-298
13. Brinton, C. C. Jr., P. Gemski Jr., S. Falkow, L. S. Baron (1961). Location of the piliation factor on the chromosome of *Escherichia coli*.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 5: 293-298
14. Brinton C. C. (1965). The structure, function, synthesis, and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria.
Trans. N. Y. Acad. Sci. 27: 1003-1054
15. Carbonetti, N., S. Boonchai, S. Parry, V. Väisänen-Rhen, T. Korhonen, P. Williams (1986). Aerobactin mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections.
Infect. Immun. 51: 966-968
16. Clegg, S. (1982). Serological heterogeneity among fimbrial antigens causing mannose-resistant hemagglutination by uropathogenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 35: 745-748

17. Dawe, C. J., and M. Potter (1957). Morphologic and biologic progression of a lymphoid neoplasm of the mouse in vivo and in vitro.
Am. J. Pathol. 33: 603
18. De Graaf, F. K., P. Klemm, W. Gaastra (1980). Purification, characterization, and partial covalent structure of *Escherichia coli* adhesive antigen K99.
Infect. Immun. 33: 877-883
19. De Graaf, F. K., and J. Roorda (1982). Production, purification, and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M.
Infect. Immun. 36: 751-753
20. De Ree, J. M., P. Schwillens, L. Promes, I. van Die, H. Bergmans, and J. F. van den Bosch (1985). Molecular cloning and characterization of F9 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. 26: 163-169
21. De Ree, J. M., P. Schwillens, and J. F. van den Bosch (1985). Molecular cloning of F11 fimbriae from a uropathogenic *Escherichia coli* and characterization of fimbriae with polyclonal and monoclonal antibodies.
FEMS Microbiol. Lett. 29: 91-97

22. Dodd, D., P. Bassford, B. Eisenstein (1984). Dependence of secretion and assembly of type 1 fimbrial subunits of *Escherichia coli* on normal protein export.
J. Bacteriol. 159: 1077-1079
23. Duguid, J. P., J. W. Smith, G. Dempster, P. N. Edmunds (1955). Non-flagellar filamentous appendages ("fimbriae") and hemagglutinating activity in *Bacterium coli*.
J. Pathol. Bacteriol. 70: 335-348
24. Duguid, J. P. (1968). The function of bacterial fimbriae.
Arch. Immunol. Ther. Exp. 16: 173-188
25. Durack, D. T., and P. B. Beeson (1977). Protective role of complement in experimental *Escherichia coli* endocarditis.
Infect. Immun. 16: 213-217
26. Eisenstein, B. I. (1981). Phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* is under transcriptional control.
Science 214: 337-339
27. Eisenstein, B. I., and D. C. Dodd (1982). Pseudocatabolite repression of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 151: 1560-1567
28. Eshdat, Y., F. J. Silverblatt, and N. Sharon (1981). Dissociation and reassembly of *Escherichia coli* type 1 fimbriae.
J. Bacteriol. 145: 308-314

29. Evans, D. G., R. P. Silver, D. J. Evans, D. G. Chase, S. L. Gorbach (1975). Plasmid controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans.
Infect. Immun. 12: 656-667
30. Evans, D. G., D. J. Evans (1978). New surface associated heat labile colonization factor antigen (CFA/I) produced by enterotoxinogenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8.
Infect. Immun. 21: 638-647
31. Evans, D. J. Jr., D. G. Evans, L. S. Young, J. Pih (1980). Haemagglutination typing of *Escherichia coli*: definition of seven haemagglutination types.
J. Clin. Microbiol. 12: 235-242
32. Falkowski, W., M. Edwards, A. Schaeffer (1986). Inhibitory effect of substituted aromatic hydrocarbons on adherence of *Escherichia coli* to human epithelial cells.
Infect. Immun. 52: 863-866
33. Freitag, C., J. Abraham, J. Clements, B. Eisenstein (1985). Genetic analysis of the phase variation control of expression of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 162: 668-675

34. Fried, F. A., C. W. Vermeulen, M. J. Ginsburg, and C. M. Cone (1971). Etiology of pyelonephritis: further evidence associating the production of experimental pyelonephritis with hemolysis in *Escherichia coli*.
J. Urol. 106: 351-354
35. Glode, M., A. Sutton, R. Moxon, J. Robbins (1977). Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1. Infect. Immun. 16: 75-80
36. Göransson, M., and B. E. Uhlin (1984). Environmental temperature regulates transcription of a virulence pili operon in *E. coli*.
EMBO J. 3: 2885-2888
37. Guinée, P. A. M., W. H. Jansen (1979). Behavior of *Escherichia coli* K antigens K88ab, K88ac and K88ad in immunoelectrophoresis, double diffusion and hemagglutination. Infect. Immun. 23: 700-705
38. Hacker, J., G. Schmidt, C. Hughes, S. Knapp, M. Marget, W. Goebel (1985). Cloning and characterization of genes involved in the production of mannose-resistant, neuraminidase-susceptible (X) fimbriae from a uropathogenic O6:K15:H31 *Escherichia coli* strain.
Infect. Immun. 47: 434-440

39. Hacker, J., H. Hof, L. Emödy, and W. Goebel (1986). Influence of cloned *Escherichia coli* hemolysin genes, S fimbriae and serum resistance on pathogenicity in different animal models.
Microb. Pathogenesis 1: 533-547
40. Hacker, J., M. Ott, G. Schmidt, R. Hull, W. Goebel (1986). Molecular cloning of the F8 fimbrial antigen from *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. 36: 139-144
41. Hacker, J., T. Jarchau, S. Knapp, R. Marre, G. Schmidt, T. Schmoll and W. Goebel (1986). Genetic and in vivo studies with S-fimbriae antigens and related virulence determinants of extraintestinal *Escherichia coli* strains. In: Protein-carbohydrate interactions in biological systems (D. L. Lark, S. Normark, B. E. Uhlin, H. Wolf-Watz eds.), Academic Press Inc. (London) Ltd. Seite 125-133
42. Hagberg, L., U. Jodal, T. K. Korhonen, G. Lidin-Janson, U. Lindberg, and C. Svanborg-Edén (1981). Adhesion, Hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections.
Infect. Immun. 31: 564-570
43. Hagberg, L., I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling, and C. Svanborg-Edén (1983). Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin.

55. Iwahi, T., Y. Abe, M. Nakao, A. Imada, and N. Tsuchiya (1983). Role of type 1 fimbriae in the pathogenesis of ascending urinary tract infection induced by *Escherichia coli* in mice.
Infect. Immun. 39: 1307-1315
56. Johnson, J. R., P. L. Roberts, W. E. Stamm (1987). P-fimbriae and other virulence factors in *Escherichia coli* urosepsis: association with patient's characteristics.
J. Infect. Dis. 156: 225-229
57. Källénus, G., and J. Winberg (1978). Bacterial adherence to periurethral epithelial cells in girls prone to urinary tract infections.
Lancet ii: 540-543
58. Källénus, G., R. Möllby, and J. Winberg (1980). In vitro adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* to human periurethral cells.
Infect. Immun. 28: 972-980
59. Karch, H., H. J. Leying, K. H. Büscher, H. P. Kroll, and W. Opferkuch (1985). Isolation and separation of physico-chemically distinct fimbrial types expressed on a single culture of *Escherichia coli* O7:K1:H6.
Infect. Immun. 47: 549--54

60. Karch, H., H. J. Leying, P. Goroncy-Bermes, H. P. Kroll, and W. Opferkuch (1985). Three-dimensional structure of fimbriae determines specificity of immune response. Infect. Immun. 50: 517-522
61. Karch, H., J. Heesemann, R. Laufs, A. D. O'Brien, C. O. Tacket, and M. M. Levine (1987). A plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O175:H7 is required for expression of a new fimbrial antigen and for adhesion to epithelial cells. Infect. Immun. 55: 455-461
62. Keith, B., L. Maurer, P. Spears, P. Orndorff (1986). Receptor-binding function of type 1 pili effects bladder colonization by a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 53: 693-696
63. Klemm, P., I. Ørskov, F. Ørskov (1982). F7 and type 1-like fimbriae from three *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections: protein chemical and immunological aspects. Infect. Immun. 36: 462-468
64. Korhonen, T. K. (1979). Yeast cell agglutination by purified enterobacterial pili. FEMS Microbiol. Lett. 6: 421-425

65. Korhonen, T. K., V. Väisänen, P. Kallio, E.-L. Nurmiaho-Lassila, H. Ranton, A. Siitonen, J. Elo, S. B. Svensson, C. Svanborg-Edén (1982). The role of pili in the adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Scand. J. Infect. Dis.* 33 (Suppl.): 26-31
66. Korhonen, T. K., V. Väisänen, H. Saxen, H. Hultberg, and S. B. Svensson (1982). P-antigen recognizing fimbriae from human uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 37: 286-291
67. Korhonen, T. K., V. Väisänen-Rhen, M. Rhen, A. Pere, J. Parkkinen, J. Finne (1984). *Escherichia coli* fimbriae recognizing sialyl-galactosides. *J. Bacteriol.* 159: 762-766
68. Korhonen, T. K., M. V. Valtonen, J. Parkkinen, V. Väisänen-Rhen, J. Finne, F. Ørskov, I. Ørskov, S. B. Svensson, and P. H. Mäkelä (1985). Serotypes hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect. Immun.* 48: 486-491
69. Korhonen, T. K., B. Nowicki, M. Rhen, V. Väisänen-Rhen, et al. (1986). Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: a mechanism of bacterial virulence. In: *Protein-carbohydrate interactions in biological systems.* (D. L. Lark, S. Normark, B.-E. Uhlin, H. Wolf-Watz, eds). Academic Press Inc. (London) Ltd. Seite 245-251

70. Korhonen, T. K., J. Parkkinen, J. Hacker, J. Finne, A. Pere, M. Rhen, H. Holthöfer (1986). Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium.
Infect. Immun. 54: 322-327
71. Korhonen, T. K., R. Virkola, H. Holthöfer (1986). Localization of binding sites for purified *Escherichia coli* P-fimbriae in the human kidney.
Infect. Immun. 54: 328-332
72. Kuriyama, S., F. Silverblatt (1986). Effect of tamm horsfall urinary glycoprotein on phagocytosis and killing of type 1-fimbriated *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 51: 193-198
73. Kuseck, B., H. Wloch, A. Mercer, V. Väisänen, G. Pluschke, T. K. Korhonen, M. Achtmann (1984). Lipopolysaccharide, capsule, and fimbriae as virulence factors among O1, O7, O16, O18, or O75 and K1, K5, or K100 *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 43: 368-379
74. Laporta, M., M. Lourdes, M. Silva, I. Sacaletzky, L. Traubsky (1986). Plasmids coding for drug resistance and localized adherence to HeLa cells in enteropathogenic *Escherichia coli* O55:H- and O55:H6.
Infect. Immun. 51: 715-717

75. Lederberg, E. M., and S. N. Cohen (1974). Transformation of *Salmonella thyphimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid.
J. Bacteriol. 119: 1072-1074
76. Leffler, H., and C. Svanborg-Edén (1980). Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes.
FEMS Microbiol. Lett. 8: 127-134
77. Levine, M. M., P. Ristaino, G. Marley, C. Smyth, S. Knutton, E. Boedecker, R. Black, C. Young, M. L. Clements, C. Cheney and R. Patnaik (1984). Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-Positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune response in humans.
Infect. Immun. 44: 409-420
78. Lindberg, F., B. Lund, S. Normark (1984). Genes of pyelonephritogenic *E. coli* required for digalactoside-specific agglutination of human cells.
EMBO J. 3: 1167-1173
79. Lindberg, F., B. Lund, S. Normark (1986). Gene products specifying adhesion of uropathogenic *Escherichia coli* are minor components of pili.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1891-1895

80. Lindberg, F., B. Lund, L. Johansson, S. Normark (1987).
Localization of the receptor-binding protein adhesin at
the tip of the bacterial pilus.
Nature 328: 84-87
81. Lomberg, H., L. A. Hansson, B. Jacobsson, U. Jodahl, H.
Leffler, and C. Svanborg-Edén (1983). Correlation of P
blood group vesicouretral reflux, and bacterial attach-
ment in patients with recurrent pyelonephritis.
N. Engl. J. Med. 308: 1189-1192
82. Lomberg, H., B. Cedergren, H. Leffler, B. Nilson, A. C.
Carlsröm, C. Svanborg-Edén (1986). Influence of blood
group on the availability of receptors for attachment of
uropathogenic *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 51: 919-926
83. Lowe, M., S. Holt, B. Eisenstein (1987). Immunoelectron
microscopic analysis of elongation of type 1 fimbriae in
Escherichia coli.
J. Bacteriol. 169: 157-163
84. Lugtenberg, B., J. Meijers, R. Peters, P. van der Hoek, and
L. van Alphen (1975). Electrophoretic resolution of the
major outer membrane proteins of *Escherichia coli* K12 into
four bands.
FEBS Lett. 58: 254-259

85. Lund, B., F. Lindberg, M. Båga, S. Normark (1985). Globoside-specific adhesins of uropathogenic *Escherichia coli* are encoded by similar trans-complementable gene clusters. *J. Bacteriol.* 162: 1293-1301
86. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrock (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.
87. Markwell, M. A. K., S. M. Haar, L. L. Bieber, W. E. Tolbert (1978). A modification of the Lowrie-procedure to simplify protein determinations in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* 87: 206-210
88. Marre, R., J. Hacker, W. Henkel, and W. Goebel (1986). Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect. Immun.* 54: 761-767
89. Marre, R., J. Hacker (1987). Role of S- and common type I-fimbriae of *Escherichia coli* in experimental upper and lower urinary tract infection. *Microb. Pathogenesis* 2: 12-16
90. Maurer, L., P. Orndorff (1985). A new locus, *pile*, required for the binding of type 1 piliated *Escherichia coli* to erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 30: 59-66

91. Maurer, L., P. Orndorff (1987). Identification and characterization of genes determining receptor binding and pilus length of *Escherichia coli* type 1 pili.
J. Bacteriol. 169: 640-645
92. Mc Cracken, G. H. Jr., L. D. Sarff, M. P. Glode, S. G. Mize, M. S. Schiffer, J. B. Robbins, E. C. Gotschlich, I. Ørskov, F. Ørskov (1974). Relation between *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide antigen and clinical outcome in neonatal meningitis.
Lancet ii: 246-250
93. Minion, F., S. Abraham, E. Beachey, J. Goguen (1986). The genetic determinant of adhesive function in type 1 fimbriae of *Escherichia coli* is distinct from the gene encoding the fimbrial subunit.
J. Bacteriol. 165: 1033-1036
94. Moch, T., H. Hoschützky, J. Hacker, K. Kröncke, K. Jann (1987). Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3462-3466
95. Montgomerie, J. Z., A. Bindereif, J. B. Neilands, G. M. Kalmanson, and B. L. Guze (1984). Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia.
Infect. Immun. 46: 835-838

96. Mooi, F. R., F. K. de Graaf, J. D. A. van Embden (1979).
Cloning, mapping and expression of genes involved in the
production of the K88ab antigen
Nucleic Acids Res. 6: 849-865
97. Mooi, F. R., A. Wijffjes, F. K. de Graaf (1983). Identi-
fication and characterization of precursors in the bio-
synthesis of the K88ab fimbriae of *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 154: 41-49
98. Moseley, S. L., G. Dougan, R. A. Schneider, H. W. Moon
(1986). Cloning of chromosomal DNA encoding the F41 adhe-
sin of enterotoxinogenic *Escherichia coli* and genetic
homology between adhesins F41 and K88.
J. Bacteriol. 167: 799-804
99. Mullnay, P., A. M. Field, M. M. Mc Connel, S. M. Scotland
H. R. Smyth, B. Rowe (1983). Expression of plasmids co-
ding for colonization factor antigen II (CFA/II) and ente-
rotoxin production in *Escherichia coli*.
J. Gen. Microbiol. 129: 3591-3601
100. Neeser, J.-R., B. Koellreutter, S. Wuersch (1986). Oligo-
mannoside-type glycopeptides inhibiting adhesion of *Esche-
richia coli* strains mediated by type 1 pili: preparation
of potent inhibitors from plant glycoprotein.
Infect. I-mun. 52: 428-436

101. Norgren, M., S. Normark, D. Lark, P. O'Hanley, G. Schoolnik, S. Falkow, C. Svanborg-Edén, M. Båga, B. E. Uhlin (1984). Mutations in *E. coli* cistrons affecting adhesion to human cells do not abolish pap pili fiber formation.
EMBO J. 3: 1159-1165
102. Normark S., D. Lark, R. Hull, M. Norgren, M. Båga, P. O'Hanley, G. Schoolnik, and S. Falkow (1983). Genetics of digalactoside-binding adhesion from a uropathogenic *Escherichia coli* strain.
Infect. Immun. 41: 942-949
- 103: Nowicki, B., M Rhen, V. Väisänen-Rhen, A. Pere, T. K. Korhonen (1984). Immunofluorescence study of fimbrial phase variation in *Escherichia coli* KS71.
J. Bacteriol. 160: 691-695
- 104: Nowicki, B., J. Vuopio-Varkila, P. Viljanen, T. K. Korhonen, and P. H. Mäkelä (1986). Fimbrial phase variation and systemic *E. coli* infection studies in the mouse peritonitis model.
Microb. Pathogenesis 1: 335-348
105. Orndorff, P., S. Falkow (1984). Organization and expression of genes responsible for type 1 piliation in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 159: 736-744

106. Orndorff, P., S. Falkow (1984). Identification and characterization of a gene product that regulates type 1 piliation in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 160: 61-66
107. Orndorff, P., S. Falkow (1985). Nucleotide sequence of *pilA*, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 162: 454-457
108. Orndorff, P., P. Spears, D. Schauer, S. Falkow (1985). Two modes of control of *pilA*, the gene encoding type 1 pili in *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 164: 321-330
109. Ørskov, I., F. Ørskov, H. W. Smith, W. J. Sojka (1975). The establishment of K99, a thermolabile transmissible *Escherichia coli* K antigen, previously called "Kco", possessed by calf and lamb enteropathogenic strains.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 83: 31-36
110. Ørskov, I., F. Ørskov, and A. Ferencz (1980). Tamm-Horsfall protein or uromucoid is the normal urinary slime that traps type 1 fimbriated *Escherichia coli*.
Lancet i: 887
111. Ørskov, F., I. Ørskov (1983). Serology of *Escherichia coli* fimbriae.
Progr. Allergy 33: 80-105

112. Ott, M., J. Hacker, T. Schmoll, T. Jarchau, T. K. Korhonen, W. Goebel (1986). Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (sfa) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections.
Infect. Immun. 54: 646-653
113. Ott, M., T. Schmoll, W. Goebel, I. van Die, and J. Hacker (1987). Comparison of the genetic determinant coding for the S-fimbrial adhesin (sfa) of *Escherichia coli* to other chromosomally encoded fimbrial determinants.
Infect. Immun. 55: 1940-1943
114. Parkkinen, J., J. Finne, M. Achtmann, V. Väisänen, T. K. Korhonen (1983). *Escherichia coli* strains binding neuraminyl-2-3-galactosides.
Biochem. Biophys. Res Commun. 111: 456-461
115. Parkkinen, J., G. N. Rogers, T. K. Korhonen, W. Dahr, J. Finne (1986). Identification of the O-linked sialyl-oligosaccharides of glycophorin A as the receptors for the S-fimbriated *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 54: 37-42
116. Pere, A., B. Nowicki, H. Saxén, A. Siitonen, and T. K. Korhonen (1987). Expression of P, type-1, and type-1C fimbriae of *Escherichia coli* in the urine of patients with acute urinary tract infection.
J. Infect. Dis. 156: 567-574

117. Rhen, M., P. H. Mäkelä, and T. K. Korhonen (1983). P-fimbriae of *Escherichia coli* are subject to phase variation.
FEMS Microbiol. Lett. 19: 267-271
118. Rhen, M., P. Klemm, T. K. Korhonen (1986). Identification of two new hemagglutinins of *Escherichia coli*, N-acetyl-D-glucosamine-specific fimbriae and a blood group M-specific agglutinin by cloning the corresponding genes in *Escherichia coli* K12.
J. Bacteriol. 168: 1234-1242
119. Rigby, P. W., J. M. Dieckmann, C. Rhodes, and P. Berg (1977). Labeling deoxiribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I.
J. Mol. Biol. 113: 237-251
120. Rottini, G., F. Cian, M. R. Soranzo, R. Albrigo, and P. Patriarca (1979). Evidence for the involvement of human polymorphonuclear leukocyte mannose-like receptors in the phagocytosis of *Escherichia coli*.
FEBS Lett. 105: 307-312
121. Schmoll, T., J. Hacker, W. Goebel (1987). Nucleotide sequence of the *sfaA* gene coding for the S fimbrial protein subunit of *Escherichia coli*.
FEMS Microbiol. Lett. 41: 229-235

122. Schmoll, T., H. Hoschützky, K. Jann, M. Ott (1988). The genetic structure of the *sfa*-determinant - a gene sequence that codes for fimbrial adhesins in *Escherichia coli* wild type strains.
Zbl. Bakt. Hyg. A im Druck
123. Schmitz, S., C. Abe, I. Moser, I. Ørskov, F. Ørskov, B. Jann, K. Jann (1986). Monoclonal antibodies against the nonhemagglutinating fimbrial antigen 1C (pseudo-type 1) of *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 51: 54-59
124. Silverblatt, F. J., J. S. Dryer, and S. Schauer (1979). Effect of pili on susceptibility of *E. coli* to phagocytosis.
Infect. Immun. 24: 218-223.
125. Smith, H. W., and M. B. Huggins (1985). The toxic role of alpha-haemolysin in the pathogenesis of experimental *Escherichia coli* infections in mice.
J. Gen. Microbiol. 131: 395-403
126. Smyth, C. J. (1982). Two mannose-resistant haemagglutinins on enterotoxigenic *Escherichia coli* of serotype O6:K15:H16 or H- isolated from traveller's and infantile diarrhoea.
J. Gen. Microbiol. 128: 2081-2096

127. Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503-517
128. Spears, P., D. Schauer, P. Orndorff (1986). Metastable regulation of type 1 piliation in *Escherichia coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. J. Bacteriol. 168: 179-185
129. Stirm, S., I. Ørskov, F. Ørskov, A. Birch-Andersen (1967). Episome-carried surface antigen K88 of *Escherichia coli*. III. Morphology. J. Bacteriol. 93: 740-748
130. Svanborg-Edén, C., and A.-M. Svennerholm (1978). Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. Infect. Immun. 22: 790-797
131. Svanborg-Edén, C., L. Hagberg, L. A. Hanson, S. Hull, R. Hull, U. Jodal, H. Leffler, H. Lomberg, E. Straube (1983). Bacterial adherence - a pathogenic mechanism in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. Progr. Allergy 33: 175-188

132. Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354
133. Uhlin, B., M. Norgren, M. Båga, S. Normark (1985). Adhesion to human cells by *Escherichia coli* lacking the major subunit of a digalactoside-specific pilus-adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1800-1804
134. Uhlin, B., M. Båga, K. Forsman, M. Göransson, F. Lindberg, B. Lund, M. Norgren, and S. Normark (1986). Regulation and biogenesis of digalactoside-binding pili. In: *Protein-carbohydrate interactions in biological systems* (D. L. Lark, S. Normark, B.-E. Uhlin, H. Wolf-Watz, eds.), Academic Press Inc. (London) Ltd. Seite 13-18
135. Ullmann, U. (1984). Die Familie der Enterobacteriaceae. II. Die Gattungen *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* und *Serratia*. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie* (H. Brandis, H. J. Otte, eds.), Gustav Fischer Verlag Stuttgart, New York. S. 291
136. Väisänen-Rhen, V., J. Elo, E. Väisänen, A. Siitonen, I. Ørskov, F. Ørskov, S. Svenson, H. Mäkelä, T. Korhonen (1984). P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect. Immun.* 43: 149-155

137. Väisänen-Rhen, V., T. K. Korhonen, and J. Finne (1983).
Novel cell-binding activity specific for N-acetyl-D-glucosamine in an *Escherichia coli* strain.
FEBS Lett. 159: 233-236
138. Van den Bosch, J. F., U. Verboom-Sohmer, P. Postma, F. de Graaf, and D. M. Mc Laren (1980). Mannose-sensitive and mannose-resistant adherence to human uroepithelial cells and urinary virulence of *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 29: 226-233
139. Van den Bosch, J. F., L. Emödy, and I. Kétyi (1982). Virulence of hemolytic strains of *Escherichia coli* in various animal models.
FEMS Microbiol. Lett. 13: 427-430
140. Van Die, I., B. van Geffen, W. Hoekstra, H. Bergmans (1984). Type 1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: cloning and characterization of the genes involved in the expression of the 1C antigen and nucleotide sequence of the subunit gene.
Gene 34: 187-196
141. Van Die, I., G. Spierings, I. van Mengen, E. Ziudweg, W. Hoekstra, H. Bergmans (1985). Cloning and genetic organization of the gene cluster encoding F7₁ fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* and comparison with the F7₂ gene cluster.
FEMS Microbiol. Lett. 28: 329-334

142. Van Die, I., M. Dijksterhuis, H. de Cock, W. Hoekstra, and H. Bergmans (1986). Structural variation of P-fimbriae from uropathogenic *Escherichia coli*.
In: Protein-carbohydrate interactions in biological systems (D. L. Lark, B.-E. Uhlin, H. Wolf-Watz, eds.), Academic Press Inc. (London) Ltd. Seite 39-46
143. Van Die, I., I. van Mengen, E. Zuidweg, W. Hoekstra, H. de Ree, H. van den Bosch, H. Bergmans (1986). Functional relationship among the gene clusters encoding F7₁, F7₂, F9 and F11 fimbriae of human uropathogenic *Escherichia coli*.
J. Bacteriol. 167: 407-410
144. Van Die, I., E. Zuidweg, W. Hoekstra, and H. Bergmans (1986). The role of fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as carriers of the adhesin involved in mannose-resistant hemagglutination.
Microb. Pathogenesis 1: 51-56
145. Welch, R. A., E. P. Dellinger, B. Minshew, and S. Falkow (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections.
Nature 294: 665-667
146. Williams, P. (1979). Novel iron uptake system specifies by ColV plasmids an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 26: 925-932

147. Williams, P., N. Carbonetti (1986). Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterocholin iron uptake systems in *Escherichia coli*.
Infect. Immun. 51: 942-947
148. Williams-Smith, H., M. Huggins (1976). Further observations on the association of the colicinV plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract.
J. Gen. Microbiol. 92: 335-350
149. Willshaw, G. A., H. R. Smith, M. M. Mc Connel, E. A. Barclay (1982). Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *Escherichia coli* serotypes.
Infect. Immun. 37: 858-868

Lebenslauf

Persönliches:

Martina Pawelzik
geb. am 12.03.1960 in Bochum
Tochter des Friedhelm Pawelzik, Ingenieur
und der Doris Pawelzik, geb. Eybisch

Schulbildung:

1966 - 1969 Besuch der Grundschule in Bochum
1969 - 1978 Besuch des Hildegardis-Gymnasiums in Bochum
1978 Abitur

Studium:

1978 Beginn des Studiums der Biologie an der Ruhr-Universität Bochum
1981 Vordiplom
1983 Diplom Biologie am Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum
Thema der Diplomarbeit: "Der Einfluß von β -Laktam-Antibiotika auf die Adhärenz von *Escherichia coli* an die Maus-Makrophagen-Zelllinie P 388D1"

Weiterbildung:

1983 bis Mai 1986 Forschungsarbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch, Lehrstuhl für Med. Mikrobiologie und Immunologie der Ruhr-Universität Bochum
Juni 1986 - Juni 1987 Forschungsaufenthalt bei Herrn Prof. Dr. Dr. J. Heesemann im Institut für Med. Mikrobiologie und Immunologie der Universität Hamburg
Ab Juli 1987 Forschungsarbeit bei Herrn Prof. Dr. W. Opferkuch, Bochum

